

Inaugural-Dissertation
zur
Erlangung der Doktorwürde
der
Naturwissenschaftlich-Mathematischen Gesamtfakultät
der
Ruprecht-Karls-Universität Heidelberg

vorgelegt von
B.Sc. und Apothekerin Julia Rötschke
geboren in Bruchsal, Deutschland
Tag der mündlichen Prüfung: 11.04.2019

**Vergleich der zellulären Pharmakokinetik und
Pharmakodynamik von Bortezomib in primären
Myelomzellen, mesenchymalen Stromazellen und
Osteoblasten, sowie Einfluss von Kombinationsregimen auf
die Anreicherung und Wirksamkeit von Bortezomib in
Zelllinien des Multiplen Myeloms**

Gutachter: Professor Dr. med. Walter Emil Haefeli
Professor Dr. rer. nat. Gert Fricker

Für meine Familie

*„Das Größte, was man erreichen kann, ist nicht,
nie zu straucheln, sondern jedes Mal wieder aufzustehen.“*

Nelson Mandela

Publikationen

Publikationen zu dieser Dissertation

Schäfer J, Weiss J, Theile D. Bosentan enhances in vitro bortezomib's antiproliferative potency against multiple myeloma by mechanisms going beyond endothelin receptor blockade. *Br J Haematol* 2018 Apr 20. doi: 10.1111/bjh.15241. [Epub ahead of print]

Schäfer J, Burhenne J, Weiss J, Theile D. Elucidating the beneficial effects of melphalan, adriamycin, and corticoids in combination with bortezomib against multiple myeloma in vitro. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 2018 Dec 15. doi: 10.1007/s00210-018-01602-1. [Epub ahead of print]

Weitere Publikationen

Schäfer J, Welte L, Seckinger A, Burhenne J, Theile D, Weiss J. Cellular effect and efficacy of carfilzomib depends on cellular net concentration gradient. *Cancer Chemother Pharmacol* 2017;80:71-79.

Clemens J, Welte L, **Schäfer J**, Seckinger A, Burhenne J, Theile D, Weiss J. Bortezomib, carfilzomib and ixazomib do not mediate relevant transporter-based drug-drug interactions. *Oncol Lett* 2017;14:3185-3192.

Dettmer S, Theile D, **Schäfer J**, Seckinger A, Burhenne J, Weiss J. Proteasome inhibition correlates with intracellular bortezomib concentrations but not with antiproliferative effects after bolus treatment in myeloma cell lines. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 2016;389:1091-101.

Turner HC, Brenner DJ, Chen Y, Bertucci A, Zhang J, Wang H, Lyulko OV, Xu Y, Shuryak I, **Schaefer J**, Simaan N, Randers-Pehrson G, Yao YL, Amundson SA, Garty G. Adapting the γ -H2AX assay for automated processing in human lymphocytes. 1. Technological aspects. *Radiat Res* 2011;175:282-90.

Poster

Schäfer J, Welte L, Seckinger A, Theile D, Burhenne J, Weiss J. *In cellulo* effect and efficacy of carfilzomib depends on extracellular/ intracellular net concentration gradient 2nd German Pharm-Tox Summit - 83rd Annual Meeting of the German Society for Experimental and Clinical Pharmacology and Toxicology (DGPT) and 19th Annual Meeting of Clinical Pharmacology (VKliPha) with contribution of AGAH, 6-9. März 2017. Heidelberg, Deutschland

Zusammenfassung

Um Frakturen osteolytischer Läsionen zu heilen und verbleibende maligne Plasmazellen zu eradizieren, könnten Bortezomib-freisetzende Knochenersatzmaterialien bei Patienten mit Multiplem Myelom eine innovative Therapieoption darstellen. Unter lokaler Freisetzung geeigneter Konzentrationen sollte der Proteasomeninhibitor Bortezomib auf Multiple Myelomzellen apoptotisch wirken, gleichzeitig aber Osteoblasten stimulieren und die Osteoklastenaktivität hemmen. In Anbetracht zellulärer Sensitivitätsunterschiede gegenüber diesem Wirkstoff müssen zur Sicherstellung der Wirksamkeit und Unbedenklichkeit dieser Darreichungsform die optimalen Freisetzungskonzentrationen bestimmt werden. Ob diese Sensitivitätsunterschiede auf eine unterschiedliche zelluläre Pharmakokinetik oder Pharmakodynamik von Bortezomib zurückzuführen sind, ist bisher unbekannt. Auch ist bislang ungeklärt, worauf die *in vivo* beschriebene Überlegenheit Bortezomib-haltiger Kombinationstherapien mit klassischen Zytostatika und Glukokortikoiden beruhen. Erneut kommen sowohl pharmakodynamische Synergien, als auch eine veränderte zelluläre Bortezomibkinetik in Frage.

Die vorliegende Arbeit verfolgte daher drei prinzipielle Ziele: (1) Mit Hilfe einer für die zu untersuchenden Zellen neu etablierten und hinsichtlich des Extraktionsverfahrens optimierten massenspektrometrischen Methode sollten erstmals die Zusammenhänge zwischen zellulärer Bortezomibkinetik, Dynamik am Proteasom und den Zusammenhängen mit der Zellviabilität in Abhängigkeit von der Konzentration und Expositionszeit in den verschiedenen Zelltypen, beschrieben werden. Zudem sollten die Expressionsmuster der katalytisch aktiven Proteasomenuntereinheiten mit der Sensitivität gegenüber Bortezomib in malignen Plasmazellen, mesenchymalen Stromazellen (*mesenchymal stroma cells*, MSC) und Osteoblasten eines Kollektivs aus gesunden Probanden und Patienten korreliert werden. (2) In klinischem Kontext sollte zudem untersucht werden, ob die Expressionshöhe der katalytischen Proteasomenuntereinheiten als prognostischer Marker für das ereignisfreie Überleben und des Gesamtüberlebens von Patienten mit Multiplem Myelom geeignet ist. (3) Ferner galt es zu evaluieren, ob die zeitgleiche Anwendung von Bortezomib mit typischen Kombinationspartnern (Doxorubicin und Dexamethason (PAd) oder Melphalan und Prednisolon (VMP) zu einer höheren Anreicherung und Wirksamkeit von Bortezomib in Multiplen Myelomzellen *in vitro* führt. Neben den bereits etablierten Wirkstoffkombinationen wurde auch erstmalig geprüft, ob die Antagonisierung des Endothelien-Signalweges in Zelllinien des Multiplen Myeloms mittels Bosentan die intrazelluläre Konzentration, die Proteasomeninhibitor oder die antiproliferative Wirksamkeit von Bortezomib beeinflusst.

Ausgehend von diesen drei primären Zielen, lassen sich die Ergebnisse wie folgt zusammenfassen: (1) Es wurde erstmalig eine deutlich unterschiedliche Akkumulation von Bortezomib (bei 5 nM Exposition) in den untersuchten Zelltypen belegt. Bortezomib zeigt zwar klinisch eine besonders hohe Wirksamkeit gegenüber malignen Myelomzellen, dieser Effekt lässt sich jedoch anhand der vorliegenden Daten nicht auf eine höhere Bortezomibakkumulation in diesen Zellen zurückführen. Da sich auch die Hemmpotenzen an den katalytischen Proteasomenuntereinheiten nicht relevant zwischen den verschiedenen Zellarten unterschieden, müssen weitere Wirkmechanismen zur selektiven Wirkung von Bortezomib auf Myelomzellen beitragen. Interessanterweise gab es keine Unterschiede hinsichtlich der zellulären Pharmakokinetik oder Pharmakodynamik zwischen MSC bzw. Osteoblasten gesunder Probanden und Multiplem Myelompatienten. Dies lässt den Rückschluss zu, dass der Einfluss der Myelomzellen auf die Zellen der Knochenmark-Mikroumgebung keinen Einfluss auf die intrazelluläre Kinetik oder Dynamik von Bortezomib hat. (2) Im Rahmen der Prüfung eines

Zusammenfassung

möglichen prädiktiven oder prognostischen Wertes der Expressionshöhen konnte gezeigt werden, dass die Expression der *chymotrypsin*-, *trypsin*- und *caspase-like* Untereinheiten (konstitutives und Immun-Proteasom in malignen und gesunden Plasmazellen, Knochenmark-Mikroumgebung) die antiproliferative Wirkung von Bortezomib oder das ereignisfreie Überleben bzw. Gesamtüberleben nicht bestimmen. (3) Die verstärkte Wirksamkeit von Bortezomib innerhalb von Kombinationstherapieregimen (PAd oder VMP) beruht nicht auf einer verbesserten zellulären Bortezomibaufnahme, sondern eher auf einer indirekten Beeinflussung der proteasomalen Hemmpotenz von Bortezomib, obwohl sich dieser pharmakodynamische Kombinationseffekt experimentell nicht in einer verbesserten antiproliferativen Wirkung widerspiegelte. Gleichzeitig konnte eindeutig belegt werden, dass auch Bosentan nicht zu einer veränderten zellulären Pharmakokinetik oder Pharmakodynamik von Bortezomib in Zelllinien des Multiplen Myeloms führt. Zusammengefasst lässt sich festhalten, dass durch eine lokale und kurzzeitige (bis zu 48 h) Freisetzung geringer Bortezomibkonzentrationen (5 nM) durch ein Knochenersatzmaterial eine selektive antiproliferative Wirkung gegenüber malignen Multiplen Myelomzellen erreicht wird. Diese gezielte Wirksamkeit beruht jedoch weder auf einer außergewöhnlichen zellulären Kinetik oder Dynamik am Proteasom, noch auf einer bestimmten Expressionshöhe der katalytischen Untereinheiten. Bei hingegen verlängerten Expositionszeiten (5 Tage) ist mit Viabilitätseinbußen bei MSC zu rechnen. Die Daten der vorliegenden Studie weisen außerdem darauf hin, dass der synergistische antiproliferative Effekt von Wirkstoffkombinationen gegenüber der alleinigen Therapie mit Bortezomib ebenfalls nicht auf eine veränderte Bortezomibkinetik bzw. Pharmakodynamik am *target* zurückzuführen ist.

Summary

To heal osteolytic bone lesions and eradicate remaining malignant plasma cells, bortezomib-releasing bone substitute materials could be an innovative therapeutic option for patients with multiple myeloma. The local release of an adequate drug concentration should lead to a direct apoptotic effect in multiple myeloma cells, while stimulating osteoblasts and inhibiting osteoclasts' activity. However, the optimal concentration to be released is yet to be determined to ensure efficacy and safety of this pharmaceutical form, especially given the known sensitivity differences of myeloma cells, osteoblasts, or osteoclasts to bortezomib. Whether these differences can be attributed to heterogeneous cellular pharmacokinetics or pharmacodynamics of bortezomib is still unknown. Moreover, it remains to be clarified which mechanisms are the underlying reason for the superior *in vivo* efficacy of bortezomib when combined with classical chemotherapeutic agents and glucocorticoids. Again, both pharmacodynamic synergies and altered cellular bortezomib-kinetics should be considered.

Consequently, the present study pursued three principle objectives: (1) To describe for the first time the association of cellular uptake kinetics of bortezomib with pharmacodynamic proteasome effects in different cell types and to investigate the dependency of cell viability on varying concentrations and exposure times by using a newly established mass spectrometrical method that had been optimized for the extraction of bortezomib from primary cells. In addition, the expression levels of the catalytic proteasomal subunits were compared to the sensitivities of malignant plasma cells, mesenchymal stromal cells (MSC), and osteoblasts to bortezomib, which were obtained from a cohort comprising healthy volunteers and multiple myeloma patients. (2) In a clinical context, the proteasomal subunit expression levels were evaluated as a potential prognostic marker for the *event-free survival* (EFS) or *overall survival* (OS) in patients with multiple myeloma. (3) Furthermore, it was scrutinised whether the concurrent exposure to bortezomib and typical combination partners (doxorubicin and dexamethasone (PAd) or melphalan and prednisolone (VMP)) leads to a higher cellular accumulation or efficacy of bortezomib in multiple myeloma cells *in vitro*. Besides such established combination regimes, the endothelin receptor antagonist bosentan was examined for the first time to potentially influence the intracellular concentration, proteasomal inhibition, or the antiproliferative efficacy of bortezomib in multiple myeloma cells *in vitro*.

Based on these three main objectives, the results can be summarized as follows: (1) For the first time, a considerably varying bortezomib accumulation (after 5 nM exposure) in the investigated cell types was demonstrated with the lowest accumulation in multiple myeloma cells. Although bortezomib exhibits highly selective apoptotic effects on multiple myeloma cells *in vivo*, our data thus demonstrate that this high efficacy cannot be attributed to higher cellular bortezomib uptake. Because bortezomib's potency to inhibit the respective catalytic proteasomal subunits did not vastly differ in the investigated cell types, alternative modes of action are expected to contribute to the selective efficacy of bortezomib in multiple myeloma cells. Interestingly, there were no differences in cellular pharmacokinetics or pharmacodynamics of bortezomib between MSC and osteoblasts in healthy volunteers or patients with multiple myeloma. This indicates that the influence of myeloma cells on the cells in the bone marrow microenvironment does not influence bortezomib's intracellular kinetics or dynamics. (2) The quantities of the chymotrypsin-, trypsin- or caspase-like subunits (constitutive and immuno-proteasome from both malignant and healthy plasma cells) do not determine antiproliferative effects in multiple myeloma cells or predict EFS/OS of patients. (3) The superior efficacy of bortezomib within combination therapy regimes (PAd or VMP) cannot be

Summary

attributed to an altered cellular bortezomib uptake. Alternatively, it rather originates from an indirect effect on proteasomal subunit functionality potentiating bortezomib's inhibitory potency. However, this pharmacodynamic effect did not translate into an enhanced antiproliferative effect *in vitro*. Moreover, bosentan was clearly demonstrated to not lead to altered cellular pharmacokinetics or pharmacodynamics of bortezomib in multiple myeloma cell lines *in vitro*, contradicting recent assumptions.

In summary, local and short release (up to 48 h) of low bortezomib doses (5 nM) from a bone substitute material will achieve a selective antiproliferative effect against multiple myeloma cells.

However, this selective efficacy of bortezomib can neither be attributed to an enhanced uptake of bortezomib into the myeloma cells (cellular pharmacokinetics), nor to an extraordinary pharmacodynamic effect at the proteasome, or to higher proteasomal subunit expression levels. In contrast, prolonged exposure times (5 d) could lead to adversely reduced viability of MSC. Finally, the present study also indicates that clinically known antiproliferative synergisms of bortezomib with standard combination compounds do likely not originate from altered cellular bortezomib kinetics or pharmacodynamics at the molecular target.

.

Inhaltsverzeichnis

Publikationen.....	5
Inhaltsverzeichnis.....	1
Abbildungs- und Tabellenverzeichnis	6
Abkürzungsverzeichnis	14
1. Einleitung.....	19
1.1 <i>Multiples Myelom</i>	<i>19</i>
1.1.1 Hintergrund	19
1.1.2 Molekulare Pathophysiologie des Multiplen Myeloms.....	20
1.2 <i>Knochensubstanzdefekte im Kontext des Multiplen Myeloms</i>	<i>21</i>
1.2.1 Mesenchymale Stromazellen	21
1.2.2 Osteoblasten.....	23
1.2.3 Osteoklasten	24
1.3 <i>Therapieansätze.....</i>	<i>24</i>
1.4 <i>Der Ubiquitin-Proteasom-Signalweg</i>	<i>25</i>
1.5 <i>Proteasomeninhibitoren</i>	<i>28</i>
1.5.1 Bortezomib	30
1.5.2 Bortezomib-freisetzende Knochenersatzwerkstoffe.....	35
1.6 <i>Der Endothelin-Signalweg im Kontext des Multiplen Myeloms.....</i>	<i>36</i>
1.7 <i>Zielsetzung der Arbeit</i>	<i>38</i>
2. Material und Methoden	41
2.1 <i>Übersicht der verwendeten Reagenzien, Verbrauchsmaterialien und Geräte.....</i>	<i>41</i>
2.2 <i>Probenaufarbeitung.....</i>	<i>48</i>
2.2.1 Rekrutierung geeigneter Probanden und Patienten	48
2.2.2 Probengewinnung und Plasmazellaufreinigung	48
2.3 <i>Zellkultur</i>	<i>50</i>
2.3.1 Zellkulturbedingungen humaner Myelomzelllinien	50
2.3.2 Zellkulturbedingungen primärer Myelomzellen.....	50
2.3.3 Zellkulturbedingungen MSC	50
2.3.4 Zellkulturbedingungen für die osteogene Differenzierung	51
2.3.5 Zellkulturbedingungen adipogene Differenzierung	52
2.3.6 Zellzählung mittels CASY® TTC.....	52
2.3.7 Kryokonservierung und Lagerung.....	53
2.3.8 Test auf Infektion der Zellen mit Mykoplasmen.....	54
2.4 <i>Charakterisierung von MSC.....</i>	<i>54</i>
2.4.1 Durchflusszytometrische Charakterisierung	55
2.4.2 Nachweis des osteogenen Differenzierungspotentials	55
2.4.3 Nachweis des adipogenen Differenzierungspotentials	56
2.5 <i>Bortezomibquantifizierung mittels UPLC/MS/MS</i>	<i>56</i>
2.5.1 Bortezomibexposition der Zellen und Probenaufarbeitung.....	57
2.5.2 Standardlösungen der UPLC/MS/MS Methode.....	61

2.5.3	LLE-Methode zur Extraktion von Bortezomib aus Zellpellets und korrespondierendem Zellkulturüberstand.....	62
2.5.4	SPE-Methode zur Extraktion von Bortezomib aus Zellpellets und korrespondierendem Zellkulturüberstand.....	62
2.5.5	Berechnung der intra- und extrazellulären Bortezomibkonzentration.....	63
2.6	<i>Einfluss von Bortezomib auf die Zellviabilität</i>	63
2.6.1	Bestimmung der Sensitivität gegenüber Wirkstoffen in Zelllinien des Multiplen Myeloms.....	64
2.6.2	Bestimmung der Sensitivität gegenüber Bortezomib in MSC	65
2.6.3	Bestimmung der Sensitivität gegenüber Bortezomib in Osteoblasten	65
2.7	<i>Aktivitätsbestimmung der Proteasomenuntereinheiten</i>	65
2.7.1	Bestimmung der Aktivität der Proteasomenuntereinheiten nach Wirkstoffexposition in Zelllinien des Multiplen Myeloms.....	66
2.7.2	Bestimmung der Aktivität der Proteasomenuntereinheiten nach Bortezomibexposition in MSC	68
2.7.3	Bestimmung der Aktivität der Proteasomenuntereinheiten nach Bortezomibexposition in Osteoblasten	68
2.8	<i>Simultaner Versuchsaufbau</i>	69
2.8.1	Intrazelluläre Anreicherung von Bortezomib allein bzw. innerhalb der Kombinationstherapieregime PAD und VMP, sowie Untersuchung der Wirksamkeit von Bortezomib in Bezug auf die Zellviabilität und Proteasomenaktivität in Zelllinien des Multiplen Myeloms innerhalb der Wirkstoffkombinationen	69
2.8.2	Intrazelluläre Anreicherung von Bortezomib und deren Auswirkung auf die Zellviabilität und Proteasomenaktivität in MSC und Osteoblasten.....	70
2.8.3	Intrazelluläre Anreicherung von Bortezomib in Kombination mit Bosentan und deren Auswirkung auf die Zellviabilität und Proteasomenaktivität.....	70
2.9	<i>GEP</i>	71
2.9.1	Rekrutierung gesunder Probanden und Patienten	71
2.9.2	Probenaufbereitung	71
2.9.3	RNA Extraktion.....	72
2.9.4	DNA Microarray	72
2.10	<i>Basale messenger Ribonukleinsäure (mRNA)-Expressionsanalyse von ET-1 und ET_A- und ET_B-Rezeptoren in Zelllinien des Multiplen Myeloms</i>	72
2.10.1	RNA-Extraktion	72
2.10.2	cDNA Synthese	73
2.10.3	qPCR.....	73
2.11	<i>Bestimmung der ET_B-Rezeptor-Expression mittels Western Blot</i>	74
2.11.1	Proteinbestimmung	75
2.11.2	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese.....	75
2.11.3	Blotten der Gele	76
2.11.4	Entwicklung der Blots	76
2.12	<i>ET-1 Quantifizierung in Zellkulturüberständen der Myelomzelllinien mittels enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)</i>	76
2.13	<i>Zytotoxizitätsbestimmung von Bosentan in Zelllinien des Multiplen Myeloms</i>	77
2.14	<i>Statistische Analyse</i>	77
3.	Ergebnisse	80
3.1	<i>Etablierung der Expansion, osteogenen Differenzierung und Charakterisierung der MSC</i>	80
3.1.1	Etablierung der Expansion von MSC.....	80

3.1.2	Etablierung der osteogenen Differenzierung von MSC.....	81
3.1.3	Test auf Verunreinigung mit Mykoplasmen	81
3.1.4	Durchflusszytometrische Charakterisierung der MSC.....	82
3.1.5	Nachweis des osteogenen und adipogenen Differenzierungspotentials der MSC	85
3.2	<i>Adaption der UPLC/MS/MS Methode zur Quantifizierung von Bortezomib in Proben aus primären Zellen, MSC und Osteoblasten</i>	<i>88</i>
3.2.1	Adaption der UPLC/MS/MS Methode zur Quantifizierung von Bortezomib in Proben aus MSC und Osteoblasten.....	89
3.2.2	Validierung der Quantifizierung von Bortezomib mittels UPLC/MS/MS unter Anwendung der Festphasenextraktionsmethode	90
3.3	<i>Bestimmung der intra- und extrazellulären Bortezomibkonzentration in primären Myelomzellen, MSC und Osteoblasten</i>	<i>92</i>
3.3.1	Intra- und extrazelluläre Bortezomibkonzentration in primären Myelomzellen	92
3.3.2	Zelluläre Pharmakokinetik in MSC von Normal Spendern und Patienten mit therapiepflichtigem Multiplen Myelom.....	93
3.3.2	Zelluläre Pharmakokinetik in Osteoblasten von Normal Spendern und Patienten mit therapiepflichtigem Multiplen Myelom.....	94
3.3.3	Vergleich der intrazellulären Bortezomibkonzentration über den Zeitraum von 24 h	95
3.4	<i>Einfluss von Bortezomib auf die Zellviabilität von MSC und Osteoblasten</i>	<i>97</i>
3.4.1	Konzentrations-abhängiger Einfluss von Bortezomib auf die Zellviabilität von MSC und Osteoblasten nach 48 h Exposition.....	97
3.4.2	Konzentrations-abhängiger Einfluss von Bortezomib auf die Zellviabilität von MSC nach 5 Tagen Exposition	98
3.5	<i>Einfluss von Bortezomib auf die Proteasomenaktivität von MSC und Osteoblasten.....</i>	<i>100</i>
3.5.1	Bestimmung der inhibitorischen Potenz von Bortezomib auf die katalytische Aktivität der Proteasomenuntereinheiten in MSC und Osteoblasten	100
3.5.2	Einfluss der Expositionsdauer von 5 nM Bortezomib auf die Aktivität der Proteasomenuntereinheiten.....	104
3.6	<i>Zusammenhang zwischen der Expression der enzymatischen Proteasomenuntereinheiten und der Wirksamkeit von Bortezomib in Bezug auf die Reduktion der Zellviabilität und Aktivität der katalytischen Proteasomenuntereinheiten.....</i>	<i>105</i>
3.6.1	Expression der Proteasomenuntereinheiten in Zelllinien des Multiplen Myeloms, Patienten mit Multiplem Myelom, MSC und Osteoblasten.....	106
3.6.2	Korrelation der intrazellulären Bortezomibakkumulation mit der Expression der katalytischen Proteasomenuntereinheiten in Zelllinien des Multiplen Myeloms.....	109
3.6.3	Zusammenhang zwischen der inhibitorischen Potenz (IC ₅₀) von Bortezomib an den CT- und T-like Untereinheiten mit der Expression dieser Proteasomenuntereinheiten in Zelllinien des Multiplen Myeloms.....	111
3.6.4	Zusammenhang zwischen der Expression der enzymatischen Proteasomenuntereinheiten mit dem ereignisfreien Überleben und Gesamtüberleben von Patienten mit Multiplem Myelom	112
3.7	<i>Einfluss der Kombinationstherapieregime PAd und VMP auf die intrazelluläre Bortezomibakkumulation, Zellviabilität und Inhibition der Proteasomenuntereinheiten</i>	<i>114</i>
3.7.1	Intra- und extrazelluläre Bortezomibkonzentration in Zelllinien des Multiplen Myeloms innerhalb der Kombinationstherapieregime PAd und VMP	115
3.7.2	Einfluss von Bortezomib auf die Zellviabilität verschiedener Zelllinien des Multiplen Myeloms innerhalb der Kombinationstherapieregime PAd und VMP nach 24 h Expositionszeit	118
3.7.3	Bestimmung der inhibitorischen Potenz von Bortezomib, Doxorubicin, Dexamethason, Prednisolon, Melphalan sowie von Bortezomib innerhalb der Kombinations-therapieregime PAd und VMP an den Proteasomenuntereinheiten	120

3.7.4	Einfluss der Expositionsdauer von 5 nM Bortezomib allein oder innerhalb der Kombinationstherapieregime PAd und VMP auf die Aktivität der Proteasomenuntereinheiten	121
3.8	<i>Einfluss von Bosentan in Kombination mit Bortezomib auf die intrazelluläre Bortezomibkonzentration, Viabilität und Inhibition der Proteasomenuntereinheiten in Zelllinien des Multiplen Myeloms</i>	123
3.8.1	Expression und Freisetzung von ET-1	123
3.8.2	Expression von ET _A - und ET _B -Rezeptoren	125
3.8.3	Intra- und extrazelluläre Anreicherung von Bortezomib in Kombination mit Bosentan in Zelllinien des Multiplen Myeloms	127
3.8.4	Einfluss von Bortezomib allein oder in Kombination mit ET-1 und Endothelinrezeptor-Antagonisten auf die Viabilität von Zelllinien des Multiplen Myeloms nach 48 h Exposition	129
3.8.5	Inhibitorische Potenz von Bortezomib allein oder in Kombination mit 100 µM Bosentan auf die Zellviabilität von Myelomzelllinien nach 5 Tagen Expositionszeit	130
3.8.6	Einfluss von Endothelinrezeptor-Antagonisten auf die Aktivität der Proteasomenuntereinheiten in Myelomzelllinien	131
3.8.7	Untersuchung der Zytotoxizität von 100 µM Bosentan	132
4.	Diskussion	133
4.1	<i>Methodenentwicklung und Etablierung</i>	134
4.1.1	Etablierung der Kultur von MSC und Osteoblasten sowie deren Charakterisierung nach ISCT Richtlinien	134
4.1.2	Adaption und Validierung der optimierten UPLC/MS/MS Methode zur Quantifizierung von Bortezomib in primären Zellen, MSC und Osteoblasten	135
4.2	<i>Vergleich der zellulären Pharmakokinetik und Pharmakodynamik von Bortezomib in primären Myelomzellen, Zelllinien des Multiplen Myeloms, MSC und Osteoblasten</i>	136
4.3	<i>Zusammenhang zwischen der Expression von katalytischen Proteasomenuntereinheiten und der zellulären Pharmakokinetik und Pharmakodynamik von Bortezomib in Multiplen Myelomzelllinien sowie dem ereignisfreien Überleben und Gesamtüberleben von Patienten</i>	138
4.4	<i>Vergleich der zellulären Pharmakokinetik und Pharmakodynamik von Bortezomib allein und innerhalb der Kombinationstherapieregime PAd und VMP in Zelllinien des Multiplen Myeloms</i>	140
4.5	<i>Einfluss des Endothelin-Signalweges auf die Wirksamkeit von Bortezomib bei Kombination mit Endothelinrezeptor-Antagonisten und ET-1 gegenüber der Einzelsubstanz Bortezomib in Zelllinien des Multiplen Myeloms</i>	141
5.	Konklusion und Ausblick	143
6.	Literaturverzeichnis	145
7.	Anhang	177
7.1	<i>Einfluss von Bortezomib auf die Zellviabilität von MSC und Osteoblasten</i>	177
7.1.1	Sensitivität von MSC gegenüber Bortezomib nach 48 h Expositionszeit	177
7.1.2	Sensitivität von Osteoblasten gegenüber Bortezomib nach 48 h Exposition	178
7.2	<i>Einfluss von Bortezomib auf die Aktivität der drei Proteasomenuntereinheiten von MSC und Osteoblasten</i>	179
7.2.1	Einfluss der Expositionsdauer von 5 nM Bortezomib auf die Aktivität der Proteasomenuntereinheiten in MSC von Normalspendern und Patienten	179
7.2.2	Einfluss der Expositionsdauer von 5 nM Bortezomib auf die Aktivität der Proteasomenuntereinheiten in Osteoblasten von Normalspendern und Patienten	181

<i>7.3 Zusammenhang zwischen der Expression der enzymatischen Proteasomenuntereinheiten und der intrazellulären Bortezomibakkumulation, der inhibitorischen Potenz an den Proteasomenuntereinheiten, dem ereignisfreien Überleben und dem Gesamtüberleben</i>	<i>183</i>
7.3.1 Zusammenhang zwischen der Expression der enzymatischen Proteasomenuntereinheiten und der intrazellulären Bortezomibakkumulation nach 6 bzw. 24 h Exposition mit 5 nM Bortezomib	183
7.3.2 Zusammenhang zwischen der Expression und der inhibitorischen Potenz (IC ₅₀) von Bortezomib an den enzymatischen Proteasomenuntereinheiten	184
7.3.3 Zusammenhang zwischen der Expression der enzymatischen Proteasomenuntereinheiten und dem ereignisfreien Überleben und Gesamtüberleben in Patienten mit Multiplem Myelom in der Validierungskohorte	185
<i>7.4 Sensitivität der Myelomzellen gegenüber Bortezomib und inhibitorischen Potenz an den Proteasomenuntereinheiten von Bortezomib innerhalb der Kombinationstherapieregime PAd und VMP</i>	<i>187</i>
7.4.1 Konzentrations-Wirkungs-Kurven von Zelllinien des Multiplen Myeloms von Bortezomib innerhalb der Kombinationstherapieregime PAd und VMP nach 24 h Exposition	187
7.4.2 Einfluss der Expositionsdauer von 5 nM Bortezomib allein oder innerhalb der Kombinationstherapieregime PAd und VMP auf die Aktivität der Proteasomenuntereinheiten	188
<i>7.5 Sensitivität der Myelomzellen gegenüber Bortezomib in Kombination mit selektiven Endothelinrezeptor-Antagonisten.....</i>	<i>192</i>
7.5.1 Sensitivität der Myelomzellen gegenüber Bortezomib allein, sowie in Kombination mit 0,1 bzw. 10 µM BQ123 und BQ788 nach 48 h Expositionszeit	192
7.5.2 Konzentrations-Wirkungs-Kurven von Zelllinien des Multiplen Myeloms von Bortezomib allein oder in Kombination mit 100 µM Bosentan nach 5 Tagen Expositionszeit	193

Abbildungs- und Tabellenverzeichnis

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Vereinfachte Darstellung des Differenzierungspotentials multipotenter mesenchymaler Stromazellen (<i>mesenchymal stromal cells</i> ; MSC) (adaptiert nach (Caplan and Bruder, 2001)).	22
Abbildung 2: Schematischer Proteinabbau durch das Ubiquitin Proteasom System.	26
Abbildung 3: Molekulare Wirkmechanismen von Bortezomib in malignen Plasmazellen und mesenchymalen Stromazellen (<i>mesenchymal stroma cells</i> , MSC).	33
Abbildung 4: Modell des Wirkstoff-freisetzenden Knochenersatzmaterials.	36
Abbildung 5: Abtrennung der mononukleären Zellfraktion (MNC) mittels mittel Biocoll Dichtegradienten-zentrifugation.	49
Abbildung 6: Messvorlage des CASY TTC® zur Bestimmung der Gesamtzellzahl [Zellen/ml], der Zellzahl der viablen Zellen [Zellen/ml], dem Zellvolumen [fl], dem Zelldurchmesser [µm] und der Zellviabilität [%] von mesenchymalen Stromazellen.	53
Abbildung 7: Versuchsaufbau zur Quantifizierung der intrazellulären Anreicherung von Bortezomib allein bzw. innerhalb der Kombinationen mit 200 nM Doxorubicin und 300 nM Dexamethason (PAd), als auch 600 nM Melphalan und 3,1 µM Prednisolon (VMP), sowie Untersuchung der Wirksamkeit von Bortezomib in Bezug auf die Zellviabilität und Proteasomenaktivität in Zelllinien des Multiplen Myeloms innerhalb der Wirkstoffkombinationen.	69
Abbildung 8: Versuchsaufbau zur Quantifizierung der intrazellulären Anreicherung von Bortezomib und deren Auswirkung auf die Zellviabilität und Proteasomenaktivität in mesenchymalen Stromazellen (<i>mesenchymal stromal cells</i> , MSC) und Osteoblasten.	70
Abbildung 9: Versuchsaufbau zur Quantifizierung der intrazellulären Anreicherung von Bortezomib in Kombination mit Bosentan und deren Auswirkung auf die Zellviabilität und Proteasomenaktivität.	71
Abbildung 10: Lichtmikroskopische Aufnahme von mesenchymalen Stromazellen (<i>mesenchymal stromal cells</i> , MSC) (Vergrößerung: 20 x).	80
Abbildung 11: Lichtmikroskopische Aufnahme von Osteoblasten (Vergrößerung 20 x).	81
Abbildung 12: Test auf Verunreinigung mit Mykoplasmen.	82
Abbildung 13: Durchflusszytometrische Charakterisierung der mesenchymalen Stromazellen (<i>mesenchymal stromal cells</i> , MSC) von gesunden Normalspendern.	84
Abbildung 14: Durchflusszytometrische Charakterisierung der mesenchymalen Stromazellen (<i>mesenchymal stromal cells</i> , MSC) von Multiplen Myelom Patienten.	85
Abbildung 15: Histochemische Qualitätskontrolle durch Nachweis der alkalischen Phosphatase (ALP), <i>alizarin red staining</i> (ARS), von Kossa- und <i>Oil Red O</i> -Färbung in differenzierten Osteoblasten und Adipozyten aus Normalspendern.	87

Abbildung 16: Histochemische Qualitätskontrolle durch Nachweis der alkalischen Phosphatase (ALP), <i>alizarin red staining</i> (ARS), von Kossa- und <i>Oil Red O</i> -Färbung in differenzierten Osteoblasten und Adipozyten aus Patienten mit Multiplem Myelom.	88
Abbildung 17: Expositionszeit-abhängige intra- und extrazelluläre Bortezomibkonzentration in Pellets von 1×10^4 Zellen der Myelomzelllinie Karpas-620.....	89
Abbildung 18: Vergleich der Extraktionsraten von Bortezomib aus den mit der <i>quality control B</i> (QC B)-Lösung versetzten Osteoblasten, P388 und mesenchymalen Stromazellen (mesenchymal stem cells, MSC).....	90
Abbildung 19: Bortezomibkonzentration [nM] in Zellpellets primärer Myelomzellen und korrespondierendem Zellkulturüberständen nach 1 h, 4 h und 24 h Exposition gegenüber 5 nM Bortezomib (gestrichelte Linie).	92
Abbildung 20: Bortezomibkonzentration [nM] in mesenchymalen Stromazellen (<i>mesenchymal stromal cells</i> , MSC) von Normalspendern bzw. Multiplen Myelom Patienten und korrespondierendem Zellkulturüberständen nach 10 min, 1 h, 2 h, 4 h, 6 h, 24 h und 48 h Exposition gegenüber 5 nM Bortezomib (gestrichelte Linie).	94
Abbildung 21: Bortezomibkonzentration [nM] in Osteoblasten von Normalspendern bzw. Myelom-Patienten und korrespondierendem Zellkulturüberständen nach 10 min, 1 h, 2 h, 4 h, 6 h, 24 h und 48 h Exposition gegenüber 5 nM Bortezomib (gestrichelte Linie).	95
Abbildung 22: <i>Area under the curve</i> (AUC) [nM x 24 h] der intra- und extrazellulären Bortezomibkonzentration von Myelomzelllinien, primärer Myelomzellen, sowie mesenchymaler Stromazellen (<i>mesenchymal stromal cells</i> , MSC), als auch Osteoblasten von Normalspendern und unbehandelter Patienten mit Multiplen Myelom über einen Expositionszeitraum von 24 h mit 5 nM Bortezomib.....	96
Abbildung 23: Konzentrations-abhängiger Einfluss von Bortezomib auf die Zellviabilität [%] von mesenchymalen Stromazellen (<i>mesenchymal stromal cells</i> , MSC) gesunder Normalspender und Patienten mit Multiplem Myelom nach 48 h Exposition.....	98
Abbildung 24: Konzentrations-abhängiger Einfluss von Bortezomib auf die Zellviabilität [%] von Osteoblasten gesunder Normalspender und Patienten mit Multiplem Myelom nach 48 h Exposition.....	98
Abbildung 25: Konzentrations-abhängiger Einfluss von Bortezomib auf die Zellviabilität [%] von mesenchymalen Stromazellen (<i>mesenchymal stromal cells</i> , MSC) gesunder Normalspender nach 5 Tagen Exposition.....	99
Abbildung 26: Konzentrations-abhängiger Einfluss von Bortezomib auf die Zellviabilität [%] von mesenchymalen Stromazellen (<i>mesenchymal stromal cells</i> , MSC) unbehandelter Patienten mit Multiplem Myelom nach 5 Tagen Exposition.	99
Abbildung 27: Exemplarische Darstellung der Bortezomibkonzentrations-abhängigen Inhibition der Aktivität der CT-, T- und C-like Proteasomenuntereinheiten [%] in mesenchymalen Stromazellen (<i>mesenchymal stromal cells</i> , MSC) des Spenders 1 und Patienten 9 nach 1-stündiger Exposition. ...	101
Abbildung 28: Inhibitorische Potenz (IC_{50}) [nM] von Bortezomib an den CT- und C-like Proteasomenuntereinheiten in Myelomzelllinien, mesenchymalen Stromazellen (<i>mesenchymal stromal cells</i> , MSC) und Osteoblasten.	104

Abbildung 29: Expositionszeit-abhängige Inhibition der Aktivität katalytischen Proteasomenuntereinheiten [%] in mesenchymalen Stromazellen (<i>mesenchymal stromal cells</i> , MSC) von Normal Spendern und Patienten.....	104
Abbildung 30: Expositionszeit-abhängige Inhibition der katalytischen Proteasomenuntereinheiten in Osteoblasten von Normal Spendern und Patienten.	105
Abbildung 31: Relative Expressionsstärke der katalytischen Untereinheiten des konstitutiven und Immun-Proteasoms in Myelomzelllinien.....	106
Abbildung 32: Relative Expressionsstärke der katalytischen Untereinheiten des konstitutiven Proteasoms in primären normalen und malignen Plasmazellen, sowie der Knochenmark-Mikroumgebung (KMMU).....	108
Abbildung 33: Relative Expressionsstärke der katalytischen Untereinheiten des Immun-Proteasoms in primären normalen und malignen Plasmazellen, sowie der Knochenmark-Mikroumgebung (KMMU).	109
Abbildung 34: Korrelation der intrazellulären Bortezomibkonzentration nach 6 h Exposition mit 5 nM Bortezomib mit der Expression C- und C _i -like Proteasomenuntereinheiten.	110
Abbildung 35: Korrelation der intrazellulären Bortezomibkonzentration in Zelllinien des Multiplen Myeloms nach 24 h Exposition mit 5 nM Bortezomib mit der Expression der T _i und C _i -like Proteasomenuntereinheiten.....	111
Abbildung 36: Korrelation der inhibitorischen Potenz (IC ₅₀) an der CT _i -like Proteasomenuntereinheit mit deren Expressionsstärke in Zelllinien des Multiplen Myeloms.	111
Abbildung 37: Zusammenhang zwischen der Expression der katalytisch aktiven, konstitutiven Proteasomenuntereinheiten und dem ereignisfreien Überleben (<i>event-free survival</i> , EFS) und Gesamtüberleben (<i>overall survival</i> ; OS).....	113
Abbildung 38: Zusammenhang zwischen der Expression der katalytisch aktiven Immun-Proteasomenuntereinheiten und dem ereignisfreien Überleben (<i>event-free survival</i> , EFS) und Gesamtüberleben (<i>overall survival</i> ; OS).....	114
Abbildung 39: Intra- und extrazelluläre Bortezomibkonzentration [nM] in Myelomzelllinien und korrespondierenden Zellkulturüberständen nach 10 min, 1 h, 2 h, 4 h, 6 h, 24 h und 48 h Exposition gegenüber 5 nM Bortezomib allein, in Kombination mit 200 nM Doxorubicin und 300 nM Dexamethason (PAd) oder 600 nM Melphalan und 3,1 µM Prednisolon (VMP).	117
Abbildung 40: <i>Area under the curve</i> (AUC) [nM x 48 h] der intra- und extrazellulären Bortezomibkonzentration von Myelomzelllinien über einen Expositionszeitraum von 48 h mit 5 nM Bortezomib allein, in Kombination mit 200 nM Doxorubicin und 300 nM Dexamethason (PAd) oder 600 nM Melphalan und 3,1 µM Prednisolon (VMP).	117
Abbildung 41: Einfluss von 300 nM Dexamethason, 200 nM Doxorubicin, 3,1 µM Prednisolon und 600 nM Melphalan auf die Zellviabilität [%] von Myelomzelllinien nach 24 h Expositionszeit.	118
Abbildung 42: Vergleich der inhibitorischen Potenz (IC ₅₀) von 0,001-10 µM Bortezomib allein, in Kombination mit 200 nM Doxorubicin und 300 nM Dexamethason (PAd) oder 600 nM Melphalan und 3,1 µM Prednisolon (VMP) in Bezug auf die Zellviabilität von Myelomzelllinien nach 24 h Expositionszeit.....	119

Abbildung 43: Zelllinien, die nach 24 h Exposition mit 0,001-10 μM Bortezomib allein, in Kombination 200 nM Doxorubicin und 300 nM Dexamethason (PAd) oder 600 nM Melphalan und 3,1 μM Prednisolon (VMP) nicht potent in ihrer Zellviabilität [%] reduziert wurden..	119
Abbildung 44: Exemplarische Darstellung zur Bestimmung der Konzentrations-abhängigen inhibitorischen Wirksamkeit von Doxorubicin, Dexamethason, Prednisolon und Melphalan auf die katalytische Aktivität Proteasomenuntereinheiten [%] der Myelomzelllinie RPMI-8226.	120
Abbildung 45: Vergleich der inhibitorischen Potenz (IC_{50}) von 5 nM Bortezomib allein, in Kombination mit 200 nM Doxorubicin und 300 nM Dexamethason (PAd) oder 600 nM Melphalan und 3,1 μM Prednisolon (VMP) an der CT-like Proteasomenuntereinheit von Myelomzelllinien.	121
Abbildung 46: Expositionszeit-abhängige Inhibition der katalytischen Aktivität der Proteasomenuntereinheiten [%] in Myelomzelllinien durch 5 nM Bortezomib allein, in Kombination 200 nM Doxorubicin und 300 nM Dexamethason (PAd) oder 600 nM Melphalan und 3,1 μM Prednisolon (VMP).	122
Abbildung 47: Bestimmung der Expression von Endothelin 1 (ET-1) auf mRNA und Proteinebene in Zelllinien des Multiplen Myeloms.	124
Abbildung 48: Relative Expressionsstärke von Endothelin 1 (ET-1) in primären normalen und malignen Plasmazellen, sowie Myelomzelllinien.	124
Abbildung 49: Bestimmung der Endothelin A- und Endothelin B- (ET_A und ET_B) Rezeptor-Expression auf mRNA Ebene in Zelllinien des Multiplen Myeloms.	125
Abbildung 50: Relative Expressionsstärke von Endothelin A- und Endothelin B- (ET_A und ET_B) Rezeptoren in primären normalen und malignen Plasmazellen sowie Myelomzelllinien.	126
Abbildung 51: Exemplarische Darstellung der relativen Proteinquantifizierung des Endothelin B- (ET_B) Rezeptors in Zelllinien des Multiplen Myeloms.	126
Abbildung 52: Korrelationsanalyse der für den ET_B -Rezeptor codierenden mRNA Menge zur ermittelten Proteinmenge.	127
Abbildung 53: Intra- und extrazelluläre Bortezomibkonzentration [nM] in Myelomzelllinien und korrespondierendem Zellkulturüberständen nach 10 min, 1 h, 2 h, 4 h, 6 h, 24 h und 48 h Exposition gegenüber 5 nM Bortezomib allein oder in Kombination mit 100 μM Bosentan.	128
Abbildung 54: Area under the curve (AUC) [nM x 48 h] der intra- und extrazellulären Bortezomibkonzentration von Myelomzelllinien über einen Expositionszeitraum von 48 h mit 5 nM Bortezomib allein oder in Kombination mit 100 μM Bosentan.	129
Abbildung 55: Exemplarische Darstellung des Konzentrations-abhängigen Einfluss von Bosentan, BQ123 oder BQ788 auf die Zellviabilität [%] der Myelomzelllinien KMM-1 und RPMI-8226 nach 48 h Expositionszeit.	129
Abbildung 56: Vergleich der IC_{50} nach 48 h Exposition mit Bortezomib allein oder in Kombination mit 100 μM Bosentan, 100 nM ET-1, 10 μM BQ123 oder BQ788 in Bezug auf die Zellviabilität von Myelomzelllinien.	130
Abbildung 57: Exemplarische Darstellung des Einflusses von Bosentan bzw. Bosentan in Kombination mit Bortezomib im Vergleich zu Bortezomib allein auf die Aktivität der Proteasomenuntereinheiten der Myelomzelllinie KMM-1.	132

Abbildung 58: Zytotoxizität von 100 µM Bosentan in Zelllinien des Multiplen Myeloms.	132
Abbildung A.1: Konzentrations-abhängiger Einfluss von Bortezomib auf die Zellviabilität [%] von mesenchymalen Stromazellen (<i>mesenchymal stromal cells</i> , MSC) gesunder Normalspender nach 48 h Exposition.....	177
Abbildung A.2: Konzentrations-abhängiger Einfluss von Bortezomib auf die Zellviabilität [%] von mesenchymalen Stromazellen (<i>mesenchymal stromal cells</i> , MSC) von Patienten mit Multiplem Myelom nach 48 h Exposition.	178
Abbildung A.3: Konzentrations-abhängiger Einfluss von Bortezomib auf die Zellviabilität [%] von Osteoblasten gesunder Spender nach 48 h Exposition.....	179
Abbildung A.4: Konzentrations-abhängiger Einfluss von Bortezomib auf die Zellviabilität [%] der Osteoblasten von Patienten mit Multiplem Myelom nach 48 h Exposition.....	179
Abbildung A.5: Expositionszeit-abhängige Inhibition der Aktivität katalytischen Proteasomenuntereinheiten [%] in mesenchymalen Stromazellen (<i>mesenchymal stromal cells</i> , MSC) von Normalspendern.	180
Abbildung A.6: Expositionszeit-abhängige Inhibition der Aktivität katalytischen Proteasomenuntereinheiten [%] in mesenchymalen Stromazellen (<i>mesenchymal stromal cells</i> , MSC) von Patienten.	181
Abbildung A.7: Expositionszeit-abhängige Inhibition der katalytischen Proteasomenuntereinheiten in Osteoblasten von Normalspendern.....	182
Abbildung A.8: Expositionszeit-abhängige Inhibition der katalytischen Proteasomenuntereinheiten in Osteoblasten von Patienten.....	183
Abbildung A.9: Korrelation der intrazellulären Bortezomibkonzentration nach 6 h Exposition mit 5 nM Bortezomib mit der Expression der konstitutiven und Immun-Proteasomenuntereinheiten.	184
Abbildung A.10: Korrelation der intrazellulären Bortezomibkonzentration nach 24 h Exposition mit 5 nM Bortezomib mit der Expression der konstitutiven und Immun-Proteasomenuntereinheiten.	184
Abbildung A.11: Korrelation der inhibitorischen Potenz (IC ₅₀) an den CT-, T-, CT ₁ und T _{1-like} Proteasomenuntereinheiten mit deren Expressionsstärke in Zelllinien des Multiplen Myeloms.	185
Abbildung A.12: Zusammenhang zwischen der Expression der katalytisch aktiven, konstitutiven Proteasomenuntereinheiten und dem ereignisfreien Überleben (<i>event-free survival</i> , EFS) und Gesamtüberleben (<i>overall survival</i> ; OS) in der TT2/TT3 Validierungskohorte.	186
Abbildung A.13: Zusammenhang zwischen der Expression der katalytisch aktiven Immun-Proteasomenuntereinheiten und dem ereignisfreien Überleben (<i>event-free survival</i> , EFS) und Gesamtüberleben (<i>overall survival</i> ; OS) in der TT2/TT3 Validierungskohorte.	187
Abbildung A.14: Vergleich der Konzentrations-Wirkungs-Kurven von 0,001-10 µM Bortezomib allein oder in Kombination mit 300 nM Dexamethason, 200 nM Doxorubicin (PAd, orange) und 3,1 µM Prednisolon und 600 nM Melphalan (VMP, grün) in Bezug auf die Zellviabilität Multipler Myelomzelllinien nach 24 h Expositionszeit.	188
Abbildung A.15: Expositionszeit-abhängige Inhibition der katalytischen Aktivität der Proteasomenuntereinheiten [%] in Multiplen Myelomzelllinien durch 5 nM Bortezomib allein.	189

Abbildung A.16: Expositionszeit-abhängige Inhibition der katalytischen Aktivität der Proteasomen-untereinheiten [%] in Multiplen Myelomzelllinien durch 5 nM Bortezomib in Kombination mit 200 nM Doxorubicin und 300 nM Dexamethason (PAd).....	190
Abbildung A.17: Expositionszeit-abhängige Inhibition der katalytischen Aktivität der Proteasomen-untereinheiten [%] in Multiplen Myelomzelllinien durch 5 nM Bortezomib in Kombination mit 600 nM Melphalan und 3,1 µM Prednisolon (VMP).	191
Abbildung A.18: Vergleich der IC ₅₀ nach 48 h Exposition mit Bortezomib allein oder in Kombination mit 0,01 oder 10 µM BQ123 oder BQ788 in Bezug auf die Zellviabilität Multipler Myelomzelllinien.	192
Abbildung A.19: Vergleich der Konzentrations-Wirkungs-Kurven von Bortezomib allein oder in Kombination mit 100 µM Bosentan in Bezug auf die Zellviabilität Multipler Myelomzelllinien nach 5 Tagen Expositionszeit.	193

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: SLIM-CRAB Kriterien zur Diagnosestellung eines therapiepflichtigen Multiplen Myeloms (nach (Rajkumar et al., 2014)).....	19
Tabelle 2: Übersicht über die Proteasomenuntereinheiten und deren Nomenklatur.....	27
Tabelle 3: Zugelassene Proteasomeninhibitoren zur Behandlung des Multiplen Myeloms.....	28
Tabelle 4: Inhibitorische Potenz (IC ₅₀) von Bortezomib auf die katalytisch aktiven konstitutiven und Immun-Proteasomenuntereinheiten (adaptiert nach (Ettari et al., 2016))	31
Tabelle 5: Verwendete Reagenzien, Verbrauchsmaterialien und Geräte.....	41
Tabelle 6: Verwendete Stammlösungen	45
Tabelle 7: Verwendete Fluorophor-gekoppelte Antikörper zur Bestimmung der Reinheit der unsortierten Gesamtfraktion	50
Tabelle 8: Ausgesäte Menge mesenchymaler Stromazellen pro entsprechendes Zellkulturgefäß	51
Tabelle 9: Zusammensetzung des osteogenen Differenzierungsmediums.....	52
Tabelle 10: Zusammensetzung des adipogenen Differenzierungsmediums.....	52
Tabelle 11: Eluentengradient der <i>ultra-performance liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry</i> Methode zur Quantifizierung von Bortezomib.....	57
Tabelle 12: Zellart-spezifische Wirkstoffexposition unter Berücksichtigung der Expositionszeit und eingesetzten Zellmenge.....	58
Tabelle 13: Verwendete Konzentrationen und Expositionszeiten zur Bestimmung der Sensitivität gegenüber Wirkstoffen in Zelllinien des Multiplen Myeloms.....	64
Tabelle 14: Verwendete Bortezomibkonzentrationen und Expositionszeiten zur Bestimmung der Sensitivität gegenüber Bortezomib in mesenchymalen Stromazellen	65

Tabelle 15: Verwendete Bortezomibkonzentrationen und Expositionszeiten zur Bestimmung der Sensitivität gegenüber Bortezomib in Osteoblasten	65
Tabelle 16: Proteasomenuntereinheiten-spezifische, an Aminoluciferin gekoppelte Substrate des ProteasomeGlo™ Assay Kits.....	66
Tabelle 17: Verwendete Konzentrationen und Expositionszeit zur Bestimmung der Konzentrations-abhängigen Aktivität der Proteasomenuntereinheiten nach Wirkstoffexposition in Zelllinien des Multiplen Myeloms.....	67
Tabelle 18: Verwendete Konzentrationen und Expositionszeit zur Bestimmung der Expositionszeit-abhängigen Aktivität der Proteasomenuntereinheiten nach Wirkstoffexposition in Zelllinien des Multiplen Myeloms.....	67
Tabelle 19: Verwendete Konzentrationen und Expositionszeit zur Bestimmung der Konzentrations-abhängigen Aktivität der Proteasomenuntereinheiten nach Wirkstoffexposition in mesenchymalen Stromazellen	68
Tabelle 20: Primersequenzen entsprechender Referenzgene zur Normierung der quantitativen Bestimmung der Genexpression von Endothelin-1, Endothelin A- und Endothelin B-Rezeptor mittels <i>quantitative polymerase chain reaction</i>	73
Tabelle 21: Primersequenzen der Zielgene Endothelin-1 (ET-1), Endothelin A (ET _A)- und Endothelin B (ET _B)-Rezeptor zur quantitativen Bestimmung der Genexpression mittels <i>quantitative polymerase chain reaction</i> (qPCR)	74
Tabelle 22: Zusammensetzung des Proteasommix in NaCl-2-(N-Morpholino)ethansulfonsäure (MES) Puffer.....	75
Tabelle 23: Zusammensetzung des 10 %-igen <i>Ammoniumpersulfat</i> (APS) Trenngels.....	75
Tabelle 24: Zusammensetzung des Sammelgels.....	75
Tabelle 25: Übersicht der verwendeten statistischen Tests	78
Tabelle 26: Übersicht der Ergebnisse der Validierung der <i>solid phase extraction</i> Methode für Bortezomib in Zellkulturüberständen und Zellpellets	91
Tabelle 27: Inhibitorische Potenz (IC ₅₀) von Bortezomib an den CT- und C-like Proteasomenuntereinheiten in mesenchymalen Stromazellen von Normalspendern (n = 5) nach 1-stündiger Exposition mit 0,01-500 µM Bortezomib.....	101
Tabelle 28: Inhibitorische Potenz (IC ₅₀) von Bortezomib an den CT- und C-like Proteasomenuntereinheiten in mesenchymalen Stromazellen von unbehandelten Patienten mit Multiplem Myelom (n = 6) nach 1-stündiger Exposition mit 0,01-500 µM Bortezomib.....	101
Tabelle 29: Inhibitorische Potenz (IC ₅₀) von Bortezomib an den CT- und C-like Proteasomenuntereinheiten in Osteoblasten von Normalspendern (n = 6) nach 1-stündiger Exposition mit 0,01-500 µM Bortezomib	102
Tabelle 30: Inhibitorische Potenz (IC ₅₀) von Bortezomib an den CT- und C-like Proteasomenuntereinheiten Osteoblasten von unbehandelten Patienten mit Multiplem Myelom (n = 6) nach 1-stündiger Exposition mit 0,01-500 µM Bortezomib.....	102

Tabelle 31: Inhibitorische Potenz (IC_{50}) von Bortezomib an den CT- und C-like Proteasomenuntereinheiten in Myelomzelllinien (n = 6) nach 1-stündiger Exposition mit 0,001-10 μ M Bortezomib.....	103
--	------------

Tabelle 32: Inhibitorische Potenz (IC_{50}) von Bortezomib allein oder in Kombination mit 100 μ M Bosentan auf die Zellviabilität [%] von Myelomzelllinien nach 5 Tagen Expositionszeit.....	130
---	------------

Abkürzungsverzeichnis

ACN	Acetonitril
ACTB	β-Actin
ALP	Alkalische Phosphatase
APS	Ammoniumpersulfat
ARS	<i>alizarin red staining</i>
ASCT	<i>autologous stem-cell transplantation</i>
ATP	Adenosintriphosphat
AUC	<i>area under the curve</i>
Auto MACS	<i>automated magnetic-activated cell sorter</i>
β2mg	β2-Mikroglobulin
BAX	<i>B-cell lymphoma 2 (Bcl-2)-associated X protein</i>
BCA	Bicinchoninsäure
Bcl-2	<i>B-cell lymphoma 2</i>
BEH	<i>ethylen bridged hybrid</i>
BMP	<i>bone morphogenic proteins</i>
BMPC	<i>bone marrow plasma cells</i>
B-RAF	<i>B-rapidly accelerated fibrosarcoma</i>
BSA	bovines Serumalbumin
C-like	<i>caspase-like</i>
CAM-DR	<i>cell-adhesion mediated drug resistance</i>
CCL3	<i>macrophage inflammatory protein 1-alpha</i>
cDNA	<i>complementary desoxyribonucleic acid</i>
CD	<i>cluster of differentiation</i>
CDK	<i>cyclin dependant kinase</i>
C _{max}	Maximale Konzentration
Cp	<i>crossing point</i>
CPC	<i>calcium-phosphate cement</i>
CRR1	<i>C-C-motif chemokine receptor 1</i>
CT-like	<i>chymotrypsin-like</i>
CYP	Cytochrom P450
d	Tage
DEXA	Dexamethason
DKK1	<i>Dickkopf-related protein 1</i>
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	<i>desoxyribonucleic acid</i>
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
DOXO	Doxorubicin
DTT	Dithiothreitol
DUB	<i>deubiquitinating enzyme</i>
E1	<i>ubiquitin-activating enzyme</i>
E2	<i>ubiquitin-conjugating enzyme</i>
E3	<i>ubiquitin-ligase enzyme</i>

Abkürzungsverzeichnis

ECE-1	<i>endothelin converting enzyme-1</i>
ECE-2	<i>endothelin converting enzyme-2</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EFS	<i>event-free survival</i>
ELISA	<i>enzyme-linked immunosorbent assay</i>
EMA	<i>European Medicines Agency</i>
ER	Endoplasmatisches Retikulum
ESI	Elektrosprayionisation
ET-1	Endothelin-1
ET-2	Endothelin-2
ET-3	Endothelin-3
ET _A -Rezeptor	Endothelinrezeptor A
ET _B -Rezeptor	Endothelinrezeptor B
FCS	<i>fetal calf serum</i>
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
FISH	Fluoreszenz in situ Hybridisierung
FITC	Fluorescein-Isothiocyanat
G6PDH	Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
GC-RMA-algorithm	<i>GC-corrected robust microarray average</i>
GEP	<i>Gene expression profiling</i>
GLU	Glutamin
GU	β-Glucuronidase
HBSS	Hank's Balanced Salt Solution
HDAC	Histon-Deacetylase
HIF1α	<i>hypoxia-inducible factor 1 alpha</i>
HLA-DR	<i>human leucocyte antigen DR-isotype</i>
HLB	<i>hydrophilic-lipophilic balanced N-vinylpyrrolidone-divinylbenzene</i>
HMCL	<i>human myeloma cell line</i>
MSC	<i>mesenchymal stromal cells</i>
hPRT	Hypoxanthin-Phosphoribosyl-Transferase 1
HSP	<i>heat-shock proteins</i>
HUPO	<i>60S human acidic ribosomal protein</i>
IBMX	3-Isobutyl-1-methylxanthin
IGF-1	<i>insulin-like growth factor 1</i>
IgG	Immunglobulin G
IgH	Immunglobulinschwerketten
IkB	<i>nuclear factor kappa light chain enhancer of activated B cells inhibitor</i>
IL-3	Interleukin-3
IL-6	Interleukin-6
IMDM	Iscove's Modified Dulbecco's Medium
INFγ	Interferon γ
IS	Interner Standard
ISCT	Internationale Gesellschaft für Zelltherapie
ITS	Insulin Transferrin Selenium
i.v.	intravenös

Abkürzungsverzeichnis

IVT	<i>in vitro transcription</i>
JNK	<i>c-Jun-N-terminal kinase</i>
KMMU	Knochenmark-Mikroumgebung
KRAS	<i>kirsten rat sarcoma</i>
L	Leucin
LDH	Laktatdehydrogenase
LLE	<i>liquid-liquid extraction</i>
LLOQ	<i>lower limit of quantification</i>
MACS	<i>magnetic-activated cell sorter</i>
MBC	<i>memory B-cells</i>
MeOH	Methanol
MES	2-(N-Morpholino)ethansulfonsäure
MGUS	monoklonale Gammopathie unklarer Signifikanz
MHC	<i>major histocompatibility complex</i>
min	Minuten
MM	Multiples Myelom
MMR	<i>relapsed/refractory multiple myeloma</i>
MNC	<i>mononuclear cells</i>
MPL	Melphalan
MPR	Melphalan, Prednison, Revlimid®
MPT	Melphalan, Prednison, Thalidomid
M-Protein	Monoklonales Paraprotein
MRD	<i>minimal residual disease</i>
MIP-1 α	Macrophage inflammatory protein 1-alpha
miRNA	<i>micro ribonucleic acid</i>
mRNA	<i>messenger ribonucleic acid</i>
MTBE	Methyl-tert-butylether
NAD	Nicotinamidadenindinukleotid
NF- κ B	<i>nuclear factor kappa light chain enhancer of activated B cells</i>
nL	Norleucin
OATP1B3	<i>organic anion transporting polypeptide 1B3</i>
OB	Osteoblasten
OPG	Osteopontin
OS	<i>overall survival</i>
P	Prolin
PAd	PS-341 (Bortezomib), Adriamycin, Dexamethason
PANP	<i>presence-absence calls with negative probesets</i>
PBS	<i>phosphate buffered saline</i>
PCR	<i>polymerase chain reaction</i>
PE	Phycoerythrin
PEI-Mal	<i>maltose-modified polyethyleneimine</i>
P-gp	P-Glycoprotein
PMMA	Polymethacrylate
POMP	<i>proteasome maturation protein</i>
PPC	<i>polyclonal plasmablastic cells</i>
PPE	<i>protein precipitation extraction</i>

Abkürzungsverzeichnis

PRED	Prednisolon
PS	Penicillin Streptomycin
PTH	<i>parathyroid hormone</i>
QC	<i>quality control</i>
qPCR	<i>quantitative polymerase chain reaction</i>
R	Arginin
Rd	Revlimid®, Dexamethason
RANK	<i>receptor activator of nuclear factor-κB</i>
RANKL	<i>receptor activator of nuclear factor-κB-ligand</i>
RNAse	Ribonuklease
ROS	Reaktive Sauerstoffspezies
RPII	<i>ribosomal ribonucleic acid polymerase II</i>
RPL13	<i>ribosomal protein L13</i>
rpm	<i>rounds per minute</i>
RPMI	Roswell Park Memorial Institut
rRNA	<i>ribosomal ribonucleic acid</i>
RT	Raumtemperatur
RT-qPCR	<i>reverse transcription-quantitative polymerase chain reaction</i>
Runx2/Cbfa	<i>runx-related transcription faktor 2/core-binding factor alpha (1)</i>
s.c.	subcutan
SD	Standardabweichung
SDS	<i>sodium dodecyl sulfate</i>
SDS-PAGE	<i>sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis</i>
SFB/TRR 79	Sonderforschungsbereich/Transregio 79
siRNA	<i>small interfering RNA</i>
Succ	Succinyl
SPE	<i>solid phase extraction</i>
T-like	<i>trypsin-like</i>
TBE	Tris-Borsäure-Ethylendiamintetraessigsäure-Puffer
TEMED	Tetramethylethylenediamin
TGF β	<i>transforming growth factor beta</i>
TNF- α	<i>tumor necrosis factor alpha</i>
TRAF6	<i>TNF receptor associated factor</i>
TRIS	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
TT2	<i>total therapy 2</i>
TT3	<i>total therapy 3</i>
UPLC/MS/MS	<i>Ultra-Performance Liquid Chromatography gekoppelt mit einem Tandem Massenspektrometer</i>
UPP	<i>ubiquitin-proteasome-pathway</i>
UPR	<i>unfolded protein response</i>
V	Valin
VCAM1	<i>vascular cell adhesion protein 1</i>
VCD	Velcade®, Cyclophosphamid, Dexamethason
VD	Velcade®, Dexamethason
VEGF	<i>vascular endothelial growth factor</i>
VL-4	<i>very late anitgen 4</i>

Abkürzungsverzeichnis

VMP	Velcade, Melphalan, Prednison
VRD	Velcade, Revlimid, Dexamethason
WNT	<i>wingless and integration-1</i>
XBP-1	<i>X-box binding protein 1</i>
Y	Tyrosin

1. Einleitung


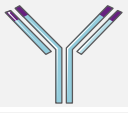

1.1 Multiples Myelom

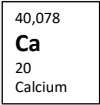



1.1.1 Hintergrund

Das Multiple Myelom stellt eine maligne Plasmazellerkrankung mit einer medianen Überlebensrate von 8-9 Jahren nach intensiver Therapie dar (Barlogie et al., 2014; Siegel et al., 2018a; Siegel et al., 2018b). Terminal differenzierte abnormale Plasmazellen („Myelomzellen“) finden sich bei dieser Erkrankung vorwiegend im Knochenmark der Patienten, allerdings auch in geringerer Häufigkeit in anderen Geweben (Kumar et al., 2017b). Bei ca. 97 % der Patienten sezernieren die Multiplen Myelomzellen ein charakteristisches monoklonales Paraprotein (M-Protein) oder freie monoklonale Leichtketten (Dupuis and Tuchman, 2016).

Durch Interaktion der malignen Plasmazellen mit der Knochenmark-Mikroumgebung kommt es zum Abbau der Knochenmatrix unter Freisetzung von Kalzium und Verdrängung der im Knochenmark lokalisierten hämatopoetischen Zellen. Durch die erhöhte Anzahl von Myelomzellen bzw. durch die Tumorlast werden vermehrt M-Proteine sezerniert, die durch Akkumulation in der Niere zu einer renalen Insuffizienz führen können. Zusammengefasst führen diese pathophysiologischen Veränderungen zu den charakteristischen klinischen Zeichen der Erkrankung. Diese umfassen unter anderem: Hyperkalzämie, Frakturen, Anämie, Einschränkung der Nierenfunktion und Infektanfälligkeit (Kumar et al., 2017b; Landgren and Rajkumar, 2016). Zur Diagnosestellung eines symptomatischen therapiepflichtigen Multiplen Myeloms werden neben Endorganschädigungen und Tumorlast vorrangig die sogenannten SLIM-CRAB Kriterien (**Tabelle 1**) zu Grunde gelegt (Rajkumar et al., 2014).

Tabelle 1: SLIM-CRAB Kriterien zur Diagnosestellung eines therapiepflichtigen Multiplen Myeloms (nach (Rajkumar et al., 2014))

S Sixty 	Klonale Plasmazellen im Knochenmark	≥ 60 %
	oder Histologisch gesichertes Plasmozytom	
L Light chains 	Freie Leichtkettenratio	≥ 100
	und Absolutwert der betroffenen Leichtkette	> 100 mg/dl
M MRT 	Fokale Läsionen in der Magnetresonanztomographie (MRT)	> 1 (> 5 mm)

Calcium 	Serum Kalziumspiegel	> 0,25 mM über dem oberen Normwert oder > 2,75 mM
	Kreatinin Clearance	< 40 ml/min
Renal 	oder Serum-Kreatinin	> 2 mg/dl
	Hämoglobin-Wert	> 2 g/dl unter dem unteren Normwert oder < 10 g/dl
Anemia 		
Bone 	Knochenläsion(en)	≥ 1 Osteolyse(n)

Die Behandlungsstrategien wurden in den letzten 20 Jahren um viele neue Wirkstoffe erweitert und zahlreiche neue Arzneistoffe befinden sich derzeit in Phase I–III der klinischen Entwicklung (Attal et al., 2017; Einsele et al., 2017; Kumar et al., 2017b; Moreau et al., 2017; Spencer et al., 2018). Das Multiple Myelom gilt derzeit immer noch für den überwiegenden Teil der Patienten als unheilbare Erkrankung, wobei neue Therapieansätze der letzten Jahre sowohl das progressionsfreie als auch das Gesamtüberleben der Patienten steigern konnten (Kumar et al., 2008; Kumar et al., 2017b; Pozzi et al., 2013; Raab et al., 2009).

1.1.2 Molekulare Pathophysiologie des Multiplen Myeloms

Für die Entwicklung neuer Wirkstoffe oder Therapiemöglichkeiten ist das Verständnis der pathophysiologischen Prozesse bis zur molekularen Ebene essentiell. Die Mechanismen, die zur Ausprägung der Krankheit, der Progression sowie deren Korrelation zu Therapieeffizienz und Überlebensrate beitragen, sind vielfältig. Aus hämatopoetischen Stammzellen reifen B-Zellen bzw. Plasmazellen durch verschiedene Differenzierungsschritte im Knochenmark sowie den lymphatischen Organen. Das Multiple Myelom lässt sich bezüglich chromosomaler Aberrationen in zwei große Gruppen einteilen: Hyperdiploide Karyotypen sind im Wesentlichen durch numerische Aberrationen gekennzeichnet, vor allem Zugewinne der Chromosomen 3, 5, 7, 9, 11, 15, 19 sowie 21. Dagegen sind non-hyperdiploide Karyotypen vor allem durch strukturelle Aberrationen gekennzeichnet. Häufig sind dies Translokationen, die den Immunglobulinschwerketten (IgH)-Lokus betreffen, sog. IgH-Translokationen (wie z.B. t(11;14), t(4;14) und t(14;16)). Durch Exom- und Genomsequenzierung großer Studienpopulationen konnten verschiedenste Mutationen (z.B. der *B-rapidly accelerated fibrosarcoma* (B-RAF)-, p53-, *kirsten rat sarcoma* (KRAS)-Gen-Mutationen) in den Myelomzellen charakterisiert werden (Manier et al., 2016). Allerdings konnte keine einheitliche *driver*-Mutation für die Entstehung und den Progress der Erkrankung gefunden werden (Bolli et al., 2017). Auch epigenetische Veränderungen spielen möglicherweise bei der Entstehung und Progression der Erkrankung eine Rolle, so finden sich sowohl DNA-Hyper-, als auch Hypo-Methylierungen, sowie verschiedene Expressionsmuster von micro-Ribonukleinsäure (miRNA, z.B. miRNA-19a und miRNA-19b) bei Patienten mit Multiplen Myelom (Macauda et al., 2017; Walker et al., 2011; Zhang et al.,

2014). Bei den zu Grunde liegenden Mechanismen der Pathophysiologie handelt es sich demnach um komplexe Zusammenhänge, die interindividuell sehr unterschiedlich sein können und im Fokus laufender Forschung stehen.

1.2 Knochensubstanzdefekte im Kontext des Multiplen Myeloms

Neben den Myelomzellen spielt in der Pathophysiologie des Multiplen Myeloms auch das umgebende Knochen-/Knochenmarkgewebe eine wichtige Rolle. Die Knochenmark-Mikroumgebung setzt sich aus verschiedensten Zellen wie Osteozyten, deren Vorläuferzellen mesenchymalen Stromazellen (*mesenchymal stromal cells*, MSC) sowie Osteoblasten, Endothelzellen, hämatopoetischen Zellen wie z.B. B- und T-Zellen und Osteoklasten zusammen. Myelomzellen interagieren direkt (z.B. über Integrine) oder mit Hilfe von Signalmolekülen (z.B. Chemokinen) mit den Zellen der Knochenmark-Mikroumgebung und werden durch einem positiven Feedbackmechanismus zur Proliferation und Migration veranlasst (Klein et al., 2011; Noll et al., 2014). Neben dem Einfluss auf die Myelomzellen selbst kommt es auch zur Verschiebung des Gleichgewichtes zwischen Osteoblasten und Osteoklasten und somit der physiologischen Knochenbildung (Xiao et al., 2016). Knochensubstanzdefekte sind mit einer schlechten Prognose assoziiert und erhöhen das Frakturrisiko der Patienten (Melton et al., 2005; Saad et al., 2007; Walker et al., 2007). Außerdem können hypothetisch in den ossären Läsionen nach erfolgreicher Chemotherapie maligne Plasmazellen verbleiben, die im Kontext der sogenannte *minimal residual disease* (MRD) und deren Zusammenhang mit der Entwicklung eines Rezidivs diskutiert werden (unveröffentlichte Daten Hose & Seckinger, mündliche Kommunikation).

1.2.1 Mesenchymale Stromazellen

MSC sind u.a. multipotente Vorläuferzellen der Osteozyten, Chondrozyten, Myozyten, Stromazellen und Adipozyten (**Abbildung 1**) (Bianco, 2014; Friedenstein et al., 1966). MSC können aus verschiedensten Geweben, wie z.B. Fettgewebe, Dentin, Nabelschnurblut oder Knochenmarkaspirat extrahiert und kultiviert werden (Hou et al., 2009; Huang et al., 2009; Pendleton et al., 2013; Pittenger et al., 1999; Wagner et al., 2005; Wang et al., 2004; Zhang et al., 2006). In einigen Studien wurde gezeigt, dass die Qualität der MSC durch das Gewebe, aus dem sie entnommen werden, dem Aufreinigungsprozess und der Kultivierung beeinflusst wird (Baksh et al., 2007; Rebelatto et al., 2008; Wagner et al., 2005)

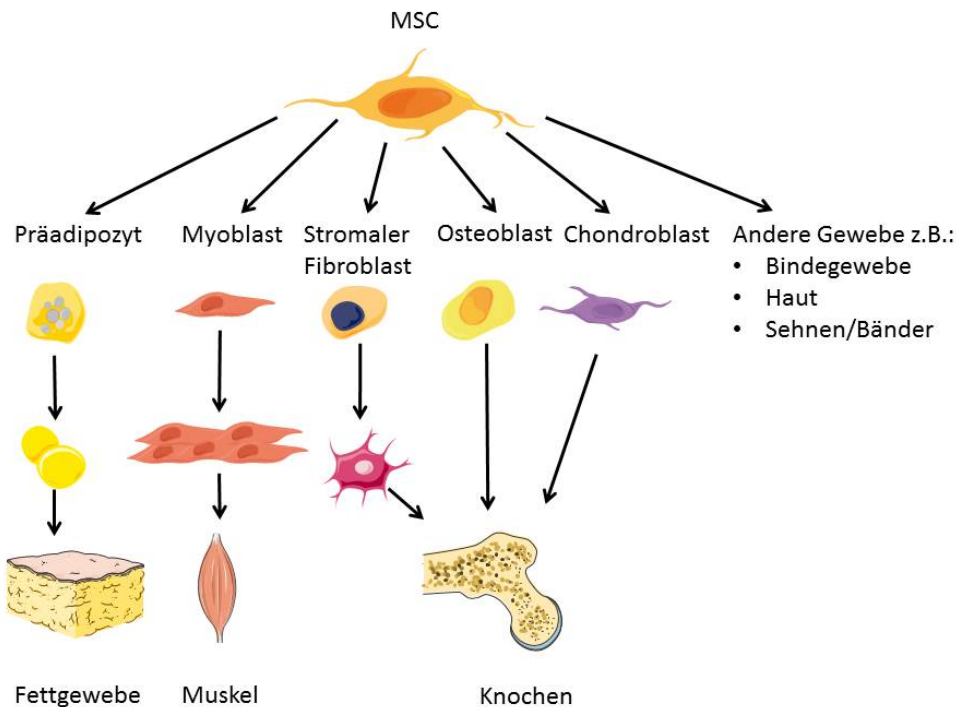


Abbildung 1: Vereinfachte Darstellung des Differenzierungspotentials multipotenter mesenchymaler Stromazellen (*mesenchymal stromal cells*; MSC) (adaptiert nach (Caplan and Bruder, 2001)). MSC lassen sich unter entsprechenden Bedingungen in folgende Gewebearten differenzieren: (1) Aus Präadipozyten zu Adipozyten, die das Fettgewebe bilden. (2) Myoblasten, die sich zu Myotuben zusammenlagern und den Aufbau der Muskeln bestimmen. (3) Stromale Fibroblasten, die als differenzierte Stromazellen das Knochenmark bilden. (4) Osteoblasten als Vorläufer der Osteozyten. (5) Chondroblasten als Vorläuferzellen der Chondrozyten, aus denen das Knorpelgewebe aufgebaut ist. Aber auch viele weitere Gewebetypen wie z.B. Bindegewebe, Haut, Sehnen und Bänder können aus MSC differenziert werden.

MSC haben keinen eindeutigen Biomarker, allerdings lassen sie sich durch mehrere Zelleigenschaften charakterisieren. Im Jahre 2006 hat die *Internationale Gesellschaft für Zelltherapie* (ISCT) zur Charakterisierung von MSC folgende Mindestkriterien definiert (Dominici et al., 2006):

1. Plastikadhärenz
2. Multipotenz mit der Fähigkeit zur osteogenen, adipogenen und chondrogenen Differenzierung
3. Expression ($\geq 95\%$) folgender Oberflächenantigene: *Cluster of differentiation* (CD) 73, CD90, CD105
4. Fehlen ($\leq 2\%$) folgender Oberflächenantigene: CD14, CD34, CD45 und *human leucocyte antigen DR-isotype* (HLA-DR)

Allerdings nimmt die Differenzierungsfähigkeit *in vitro* in Abhängigkeit vom Alter des Spenders, sowie der Passage der Zellen ab (Ganguly et al., 2017; Pittenger et al., 1999; Stenderup et al., 2003). Expansion und Differenzierung werden auch durch die Zellkulturbedingungen und insbesondere durch das in der Zellkultur verwendete fötale Kälberserum (FCS) beeinflusst (Dimarakis and Levicar, 2006; Mannello and Tonti, 2007). Generell zeigt FCS starke interindividuelle Chargenvariabilität und immunogenes Potential, das bei der Kultivierung von MSC möglichst durch das Verwenden spezieller Chargen minimiert werden soll.

In vivo bestimmt insbesondere die Mikroumgebung des Knochenmarks die Migration und Differenzierung von MSC. Die Differenzierung wird hierbei durch Proteine wie z.B. den *bone morphogenic proteins* (BMPs), Hormonen wie z.B. dem *parathyroid hormone* (PTH) und Wachstumsfaktoren wie beispielsweise dem *transforming growth factor beta* (TGF β) beeinflusst (Chen et al., 2004; Crane and Cao, 2014; Ohishi and Schipani, 2011; Panaroni et al., 2015). Eine weitere wichtige Eigenschaft der MSC ist deren inhibitorischer Einfluss auf die angeborene und erworbene Immunantwort. Sie modulieren die Immunantwort z.B. durch Freisetzung von Chemokinen und Interleukinen, welche die Proliferation, Aktivierung und Differenzierung von T- und B-Zellen oder die Degranulation von Mastzellen verhindern (Li and Hua, 2017).

MSC spielen auch bei der Entstehung der ossären Läsionen bei Patienten mit Multiplem Myelom eine wichtige Rolle. Die MSC gesunder Probanden unterscheiden sich zum einen phänotypisch gegenüber denen von Patienten mit Multiplen Myelom, zum anderen durch die unterschiedliche Expression von Signalmolekülen, membranständigen Proteinen und der reduzierten Fähigkeit zur Bildung einer Matrixmineralisierung (Arnulf et al., 2007; Corre et al., 2007; Garderet et al., 2007; Gregoret et al., 1994; Noll et al., 2014; Wallace et al., 2001).

Maligne Plasmazellen interagieren über Integrinsysteme durch direkten Zell-Zell-Kontakt mit den MSC (Gupta et al., 2001; Hideshima et al., 2004a; Hideshima et al., 2004b; Michigami et al., 2000; Mori et al., 2004; O'Donnell and Raje, 2017). Die dadurch stimulierte Sekretion von Osteoklasten-aktivierenden und die Migration und Proliferation der Myelomzellen begünstigenden Botenstoffen führen u.a. zur Progression der Osteolysen.

1.2.2 Osteoblasten

Osteoblasten entstehen durch Differenzierung von MSC. Sie stellen einen Bestandteil der Knochenmatrix dar und tragen zur Kollagensynthese und Mineralisierung bei, produzieren Osteokalzin und werden letztendlich terminal zu Osteozyten differenziert (Terpos et al., 2018b). Osteozyten machen rund 90 % der Zellen des gesunden Knochens aus (Bonewald, 2011). Bei Patienten mit Multiplem Myelom ist die aktive Osteozytenzahl vermindert (Giuliani et al., 2012).

Die verminderte Osteoblastenaktivität ist auf die Aktivierung bzw. Repression mehrere Signalwege bei Patienten mit Multiplen Myelom zu erklären. Osteoblasten sind über den *receptor activator of nuclear factor- κ B/receptor activator of nuclear factor- κ B-ligand*/Osteopontin (RANK/RANKL/OPG) Signalweg mit der Bildung von Osteoklasten verknüpft (Bonewald, 2011; Schaffler and Kennedy, 2012; Terpos and Dimopoulos, 2005). Die Bindung von RANK an RANKL führt zur Fusion der mononukleären Vorläuferzellen bei der Bildung von Osteoklasten.

Die Interaktion von Osteoblasten mit Multiplen Myelomzellen führt zu einer verstärkten Expression des RANKL und reduzierter Bildung von OPG einem löslichen RANKL-*decoy*-Rezeptor, in Osteoblasten und MSC (Giuliani et al., 2001; Giuliani et al., 2002; Seidel et al., 2001; Terpos and Dimopoulos, 2005). Eine hohe RANKL/OPG Ratio ist mit einem schlechten Krankheitsverlauf assoziiert (Terpos et al., 2003b).

Maligne Plasmazellen sezernieren verschiedene lösliche Faktoren, wie z.B. Sklerostin, *Dickkopf-related protein 1* (DKK-1) oder TGF β , welche die Differenzierung und Aktivität vermindern und damit die numerische Anzahl der Osteoblasten reduzieren (Colucci et al., 2011; Takeuchi et al., 2010; Tian et al., 2003).

1.2.3 Osteoklasten

Osteoklasten sind mehrkernige Zellen, die durch Fusion mehrerer mononukleärer hämatopoetischer Vorläuferzellen der Makrophagen-Monozyten Zelllinie entstehen (Walker, 1975). Im gesunden Knochen sind ca. 10 % der Zellen Osteoklasten (Bonewald, 2011). Die Osteoklastenzahl ist bei den charakteristisch für das Multiple Myelom vorliegenden Knochensubstanzdefekten erhöht und korreliert mit der Tumorlast der Patienten (O'Donnell and Raje, 2017; Terpos et al., 2003a). Myelomzellen stimulieren die Differenzierung von Osteoklasten über verschiedene Signalwege. Zum einen über direkt von malignen Zellen sezernierte Signalmoleküle, wie dem *vascular endothelial growth factor* (VEGF), RANKL, Interleukin-3 (IL-3) und *tumor necrosis factor alpha* (TNF- α) (Colucci et al., 2004; Giuliani et al., 2001; Gupta et al., 2001; Hideshima et al., 2001b; Lee et al., 2004; Madan et al., 1970; Nanes, 2003; Tanaka et al., 2007). Zum andern kommt es durch den Zell-Zell-Kontakt von Myelomzellen mit den umgebenden MSC zur Freisetzung von Interleukin-6 (IL-6), RANKL durch die MSC. Diese und andere löslichen Faktoren begünstigen die Differenzierung und Aktivierung von Osteoklasten (Chauhan et al., 1996; Fulciniti et al., 2009; Michigami et al., 2000; O'Donnell and Raje, 2017).

1.3 Therapieansätze

Für die Auswahl der Therapie des symptomatischen Multiplen Myeloms unterscheidet man Patienten, die noch eine Stammzelltransplantation erhalten können, und jene, die alters- oder morbiditätsbedingt oder aus freier Entscheidung nicht für eine Transplantation geeignet sind. Es wird eine möglichst lange Remission bzw. symptomfreie Lebenszeit der Patienten angestrebt. Generell existieren unterschiedliche Therapien bei neudiagnostiziertem, rezidiertem und/oder therapierefraktärem Multiplen Myelom.

Als Induktionstherapie bei neu diagnostizierten Patienten vor autologer Stammzelltransplantation (ASCT) stehen verschiedene Therapieschemata mit Bortezomib, Immunmodulatoren, klassischen Antineoplastika wie Alkylantien oder Anthrazyklinen, sowie Glukokortikoiden zur Verfügung. Als Induktionstherapiestandard in Deutschland gilt derzeit eine Kombination aus Bortezomib (Velcade®), Cyclophosphamid und Dexamethason (VCD) und einer anschließenden Mobilisations-therapie vor der Stammzell-Sammlung. Als alternative Induktionstherapie steht beispielsweise Bortezomib in Kombination mit Dexamethason und Doxorubicin (PAd) (Sonneveld et al., 2012) zur Verfügung. Nach einer Hochdosisdosistherapie mit Melphalan erfolgt eine autologe Blutstammzelltransplantation. Eine anschließende Erhaltungstherapie mit Lenalidomid oder Bortezomib wird bei Hochrisikopatienten oder vorliegender Niereninsuffizienz angesetzt (Neben et al., 2012; Scheid et al., 2014). Bei neu diagnostizierten Patienten, die nicht für die ASCT geeignet sind, setzt sich die Primärtherapie aus Melphalan und Prednison kombiniert mit entweder Bortezomib, Thalidomid sowie auch Lenalidomid (VMP, MPT, MPR) zusammen (Facon et al., 2007; Palumbo et al., 2007; San Miguel et al., 2008; Zweegman et al., 2016). Auch Lenalidomid in Kombination mit Dexamethason kann bei diesen neu diagnostizierten Patienten eingesetzt werden (Facon et al., 2018).

Die meisten symptomatischen Patienten erleiden trotz initialem Therapieerfolg mit den Standardtherapieregimen einen Progress oder ein Rezidiv (Dimopoulos et al., 2015). Bei Patienten mit einer Rezidiv-Diagnose sind u.a. Resistenzen, wie auch Therapielimitierungen durch Toxizitäten (z.B. myelosuppressive Wirkungen), Ansprechen und Progress unter der vorangegangenen Therapie zu beachten und in die Therapiewahl einzubeziehen. In diesem Fall werden Patienten unterschieden, die für eine autologe Stammzelltransplantation geeignet sind, und jene, die altersabhängig oder

anhand der Remissionsdauer nach ASCT nicht für eine weitere Transplantation geeignet sind. Die Rezidivtherapie setzt sich neben den klassischen chemotherapeutischen Agentien vorwiegend aus neuen Substanzen in Zwei- und Dreifachkombinationstherapieregimen zusammen. Hierzu zählen die Proteasomeninhibitoren Bortezomib und Carfilzomib (z.B. in Kombination Carfilzomib, Lenalidomid und Dexamethason KRD oder Bortezomib, Cyclophosphamid und Dexamethason (VCD)), den Immunmodulatoren Lenalidomid und Pomalidomid (z.B. Lenalidomid und Dexamethason (Rd)), der Histon-Deacetylase (HDAC)-Inhibitor Panobinostat (z.B. in Kombination mit Bortezomib und Dexamethason), sowie monoklonale Antikörper wie Daratumumab (Dara-VD oder auch Dara-Rd) oder Elotuzumab (Abramson, 2018; Costello, 2017; Kumar et al., 2017a; Rajkumar, 2016).

Begleitend wird zur Behandlung der osteolytischen Läsionen in Patienten mit symptomatischem Multiplen Myelom eine Bisphosphonat-Therapie mit Zoledronsäure, Pamidronsäure oder Ibandronsäure angesetzt, begleitet von einer Vitamin D3 und Kalzium Substitution (Kumar et al., 2017a; Terpos et al., 2018a). Ein Nachteil der Bisphosphonate jedoch ist, dass sie kein knochenanaboles Wirkprofil aufweisen.

1.4 Der Ubiquitin-Proteasom-Signalweg

Das zentrale Element des eukaryotischen *ubiquitin-proteasom-pathway* (UPP) bildet das multikatalytische 26S Proteasom. Der fassförmige Proteinkomplex besteht aus einem oder zwei assemblierten regulatorischen 19S-*lid*-Komplexen und einem enzymatischen 20S-*core*-Komplex (Coux et al., 1996; Driscoll and Goldberg, 1990; Hershko and Ciechanover, 1992). Das 26S-Proteasom degradiert rund 80 % der missgefalteten oder überschüssigen Proteine, die z.B. in zellulären Signalwegen eine Rolle spielen (Ciechanover, 1994; Dou et al., 1999; Konstantinova et al., 2008; Stock, 1991). Weitere Mechanismen, welche die Degradation von Proteinen durch das Proteasom ergänzen bzw. entgegenstehen, sind Aggresomen oder der lysosomale Abbau.

Das 26S Proteasom ist sowohl zytosolisch, als auch im Nukleus aller Zellen zu finden (Baumeister et al., 1998; Xu et al., 2004). Abzubauen Proteine werden in den meisten Fällen mit Polyubiquitinresten markiert (Wilkinson, 2005). Dieser Prozess gliedert sich in drei Schritte (Hershko and Ciechanover, 1998): (1) Das *ubiquitin-activating enzyme* (E1) aktiviert das freie Ubiquitin und überträgt dies auf das (2) *ubiquitin-conjugating enzyme* (E2). Die Ubiquitylierung des Zielproteins erfolgt unter Katalyse des *ubiquitin-ligase-enzyme* (E3) (Ardley and Robinson, 2005; Lee and Schindelin, 2008; van Wijk and Timmers, 2010). Das abzubauen Peptid durchläuft diese Zyklen mehrfach bis ein Polyubiquitinrest von mindestens 4 Ubiquitinmolekülen entstanden ist (siehe **Abbildung 2**).

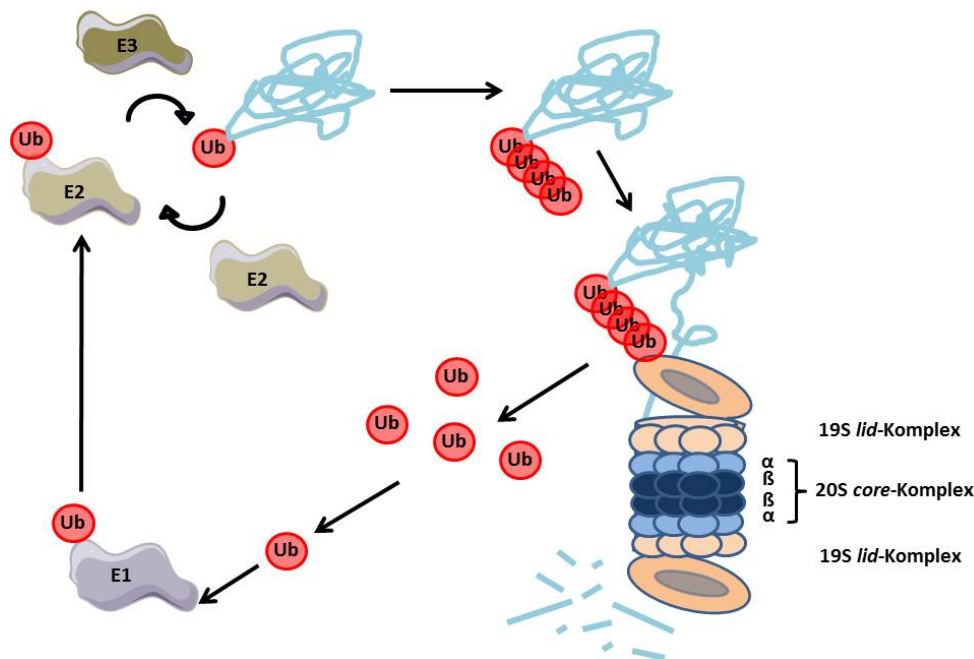


Abbildung 2: Schematischer Proteinabbau durch das Ubiquitin Proteasom System. Das freie Ubiquitin (Ub) wird durch *ubiquitin-activating enzyme* (E1) aktiviert und auf *ubiquitin-conjugating enzyme* (E2) übertragen. Unter Katalyse durch *ubiquitin-ligase-enzyme* (E3) wird das Ubiquitin an das abzubauenende Protein angehängt. Das abzubauenende Protein durchläuft mindestens 4 Zyklen der Ubiquitinylierung, bis ein ausreichend langer Polyubiquitinrest entsteht. Dieser wird vom 19S-Komplex des Proteasoms erkannt und das Peptid durch die enzymatische Aktivität des 20S-core-Komplex zerkleinert.

Der 19S *lid*-Komplex dient zur Erkennung und Entfaltung der Proteine. Nach der Erkennung der Proteine wird der Polyubiquitinrest durch dort lokalisierte *deubiquitinating enzymes* (DUBs) entfernt und das Protein in den 20S-*core*-Komplex transloziert (Hanna et al., 2006; Koulich et al., 2008; Thrower et al., 2000). Die enzymatische Spaltung der Proteine erfolgt in einer der Proteasomenuntereinheiten der *core*-Einheit. Die heptamerischen Ringe, die zusammengesetzt die charakteristische Zylinderform bilden, setzen sich aus strukturähnlichen α - und β -Untereinheiten zusammen (Unno et al., 2002). Die äußeren Ringe des Zylinders sind nicht proteolytisch aktiv und dienen als Bindeglied zwischen dem *lid*- und *core*-Komplex und bestehen aus sieben strukturgleichen α -Untereinheiten (**Tabelle 2**) (Tomko and Hochstrasser, 2013). Diese Untereinheiten dienen zum einen der Verbindung zwischen den regulatorischen Komplexen und der enzymatischen Einheit, aber auch der Translokation der Substrate (Groll et al., 2000; Sharon et al., 2006). Die drei katalytischen β -Proteasomenuntereinheiten werden je nach Spaltungsmuster in die *chymotrypsin* (CT)-*like*, *caspase* (C)-*like* und *trypsin* (T)-*like* Proteasomenuntereinheit gegliedert (**Tabelle 2**) (Groll et al., 1999; Nazif and Bogyo, 2001; Orłowski and Wilk, 2000). N-terminale Threoninreste, die in den β -Untereinheiten selbst vorliegen, dienen als Nukleophil und binden an die Proteinbindungen der abzubauenenden Substrate (Seemuller et al., 1995; Tanaka, 2009). Durch Hydrolyse wird die Proteinbindung gespalten und es entstehen kurze Peptide mit einer Länge von 2-10 Aminosäuren, die entweder noch an Ubiquitin gebunden sind, oder auch freie Peptide und abgespaltene Ubiquitinketten (Collins and Goldberg, 2017; Hershko and Ciechanover, 1998; Kisselev et al., 1999). Die entstehenden Fragmente werden im Zytosol durch Peptidasen gespalten und zur Proteinbiosynthese erneut verwendet. Die Regulation der Proteasomenaktivität auf transkriptioneller und posttranslationaler Ebene ist bisher nicht vollständig aufgeklärt. Die Expression der Proteasomenuntereinheiten wird durch

Zellstress oder auch Proteasomeninhibitoren verstärkt (Meiners et al., 2003; Zhang and Manning, 2015). Darüber hinaus kann eine posttranslationale Modifikation der Proteasomenuntereinheiten z.B. durch Phosphorylierung, Acetylierung und Ubiquitinylierung Einfluss auf die Aktivität, die Substratbindungsaffinität und die Assemblierung des Gesamtkomplexes nehmen (Besche et al., 2014; Bose et al., 2004; Isasa et al., 2010; Lokireddy et al., 2015; Satoh et al., 2001; VerPlank and Goldberg, 2017; Wang et al., 2013). Die Assemblierung des 26S-Proteasoms ist komplex und wird in mehrere Teilschritte untergliedert. Zur Bildung der *core*-Einheit wird mit Hilfe von Chaperonen zunächst der Ring der α -Untereinheiten zusammengefügt (Hirano et al., 2006). An diesem Ring werden im Anschluss die einzelnen katalytischen β -Untereinheiten aufgebaut (Hirano et al., 2005; Murata et al., 2009). Die Bildung der 19S-Einheit konnte bisher nicht vollständig geklärt werden, es ist lediglich bekannt, dass die einzelnen Bestandteile zunächst getrennt voneinander assembliert werden (Livneh et al., 2016).

Tabelle 2: Übersicht über die Proteasomenuntereinheiten und deren Nomenklatur

Proteasomenuntereinheit			Proteolytische Funktion
Systematische Nomenklatur	Sonstige Nomenklatur	Human Genome Organization Nomenklatur	
α -Untereinheiten des 20S- <i>core</i> -Komplexes			
$\alpha 1$	Iota	PSMA6	-
$\alpha 2$	C3	PSMA2	-
$\alpha 3$	C9	PSMA4	-
$\alpha 4$	C6	PSMA7	-
$\alpha 5$	Zeta	PSMA5	-
$\alpha 6$	C2	PSMA1	-
$\alpha 7$	C8	PSMA3	-
β -Untereinheiten des 20S <i>core</i> -Komplexes			
$\beta 1$	Y, delta	PSMB6	<i>Caspase-like</i>
$\beta 2$	Z	PSMB7	<i>Trypsin-like</i>
$\beta 3$	C10	PSMB3	-
$\beta 4$	C7	PSMB2	-
$\beta 5$	X, MB1, epsilon	PSMB5	<i>Chymotrypsin-like</i>
$\beta 6$	C5	PSMB1	-
$\beta 7$	N3, beta	PSMB4	-
β_i -Untereinheiten des 20S <i>core</i> -Komplexes			
$\beta 1_i$	LMP2, RING12	PSMB9	<i>Caspase-like</i>
$\beta 2_i$	MECL1, LMP10	PSMB10	<i>Trypsin-like</i>
$\beta 5_i$	LPM7, RING10	PSMB8	<i>Chymotrypsin-like</i>

Neben den bereits beschriebenen Untereinheiten können bei gesteigerter Immunabwehr die katalytischen Proteasomenuntereinheiten durch korrespondierende Immun-Proteasomenuntereinheiten ersetzt werden (Ferrington and Gregerson, 2012; Griffin et al., 1998). Dies führt dann zu einem veränderten Proteinspaltungsmuster (Huber et al., 2012). Durch Interferon γ (INF γ), TNF- α ,

sowie bakterielle Toxine kann die Expression des Immunproteasoms gesteigert werden, das vorwiegend in Zellen lymphatischen Ursprungs Peptide prozessiert, die durch Moleküle des *major histocompatibility complex* (MHC) *class 1* präsentiert werden (Goldberg et al., 2002; Kincaid et al., 2011; Rock et al., 1994). Andere Funktionen des Immunproteasomes betreffen die Differenzierung von T-Helferzellen und den Abbau von Proteinen während des oxidativen Zellstress (Kniepert and Groettrup, 2014; Pickering et al., 2010; Seifert et al., 2010).

1.5 Proteasomeninhibitoren

Zur Behandlung des Multiplen Myeloms sind die drei Proteasomeninhibitoren Bortezomib, Carfilzomib und Ixazomib von der *Food and Drug Administration* (FDA) und der *European Medicines Agency* (EMA) zugelassen (siehe **Tabelle 3**).

Tabelle 3: Zugelassene Proteasomeninhibitoren zur Behandlung des Multiplen Myeloms

Wirkstoff	Handelsname	Darreichungsform	Pharmacophor	Proteasombindung
Bortezomib	Velcade®	i.v.	Borsäure	reversibel
Carfilzomib	Kyprolis®	i.v.	Epoxyketon	irreversibel
Ixazomib	Ninlaro®	oral	Borsäure	reversibel

Weitere Neuentwicklungen, wie Oprozomib und Marizomib befinden sich derzeit noch in klinischen Studien oder in der präklinischen Phase. Weiterentwicklungen haben eine gesteigerte Wirksamkeit, Potenz der Proteasomeninhibition und ein besseres Nebenwirkungsprofil zum Ziel.

Im Modellorganismus Hefe wurden durch Mutation der *CT-like* Untereinheit des Proteasoms der Proteinabbau und das Wachstum stark reduziert (Chen and Hochstrasser, 1996; Heinemeyer et al., 1997). Eine Veränderung der T- oder C-like Proteasomenuntereinheit führte nicht zu vergleichbaren Effekten, daher wurde angenommen, dass die *CT-like* Untereinheit die bedeutsamste katalytische Funktionseinheit des Proteinabbaus durch das Proteasom darstellt (Arendt and Hochstrasser, 1997; Heinemeyer et al., 1997). Viele der entwickelten Proteasomeninhibitoren wie Bortezomib weisen aus diesem Grund auch eine sehr hohe Potenz an der *CT-like* Untereinheit auf. Mit Hilfe von Proteasomenuntereinheit-spezifischen Inhibitoren wurde im Laufe der Zeit für humane Zellen gezeigt, dass eine zytotoxische Aktivität von Proteasomeninhibitoren nicht nur durch eine Hemmung einer einzigen Proteasomenuntereinheit hervorgerufen wird, sondern dies immer durch eine Hemmung der CT- und zusätzlich der T- oder C-like Proteasomenuntereinheit erreicht wird (Britton et al., 2009; Kisselev et al., 2006). Ebenfalls wurde durch spezifische Inhibition der T-like Proteasomenuntereinheit eine Erhöhung der Sensitivität gegenüber Bortezomib und Carfilzomib in Zelllinien des Multiplen Myeloms beobachtet (Mirabella et al., 2011).

Die zytotoxische Wirkung von Proteasomeninhibitoren kann demnach nicht auf die Hemmung einer einzigen bestimmten Proteasomenuntereinheit zurückgeführt werden. Ebenso liegt der Zytotoxizität der Proteasomeninhibitoren nicht nur ein Mechanismus zu Grunde, sondern sie beruht vielmehr auf einem Zusammenspiel vieler Signalwege, die letztendlich zur Apoptose führen. Im Gegensatz zu normalen Plasmazellen kommt es bei Zellen des Multiplen Myeloms durch die gesteigerte Antikörpersynthese basal zu einem gesteigerten Anteil fehlgefalteter Proteine. Die Akkumulation dieser fehlgefalteten Proteine führt zu einem zu einer gesteigerten *unfolded protein response*

(UPR) im Endoplasmatischen Retikulum (ER), wie auch zu einem gesteigerten *workload* für die Proteasomen (Kostova and Wolf, 2003; Obeng et al., 2006; Patil and Walter, 2001). Die UPR führt zu einer verminderten Proteinbiosynthese unter gesteigerter Expression von Transkriptionsfaktoren, Proteasomenuntereinheiten, Chaperonen und Aggresomen (Lee et al., 2003; Obeng et al., 2006). Kann die UPR das durch ER-Stress verursachte zelluläre Ungleichgewicht nicht wiederherstellen, kommt es zum Zellzyklusarrest und letztendlich werden Apoptose-Mechanismen aktiviert (Brewer et al., 1999; McCullough et al., 2001; Zinszner et al., 1998). Eine Hemmung des proteasomalen Proteinabbaus führt demnach zu einer gesteigerten Akkumulation von abzubauenden Proteinen im ER und einer höheren Apoptoserate (Obeng et al., 2006).

Neben der pro-apoptotischen Wirkung durch die gesteigerte UPR wird auch die Expression anti-apoptotischer Moleküle (z.B. *B-cell lymphoma 2 (Bcl-2)-associated X protein* (BAX), NOXA, p53, Tumorsuppressorproteinen (z.B. p27) sowie der Abbau für den weiteren Ablauf des Zellzyklus wichtigen Proteine (z.B. Cyclin D oder Cyclin-abhängige Kinaseinhibitoren wie p27^{Kip1}) durch eine Inhibition der Proteasomen beeinflusst (Chen et al., 2010; Gandolfi et al., 2017; Gomez-Bougie et al., 2007; Hideshima et al., 2003; Mitsiades et al., 2002). Einer der in der Literatur meistbeschriebenen pro-apoptotischen Signalwege, der durch die Proteasomeninhibitoren beeinflusst wird, ist der des Transkriptionsfaktors *nuclear factor kappa light chain enhancer of activated B cells* (NF-κB) (Hideshima et al., 2002; Hideshima et al., 2003; Orlowski and Baldwin, 2002).

Die Ursache der Sensitivität der Zellen des Multiplen Myeloms gegenüber Proteasomeninhibitoren ist bisher nicht eindeutig geklärt. In malignen Plasmazellen nimmt durch den gesteigerten *workload* die Kapazität der Proteasomen mit steigender Antikörperproduktion ab und es kommt zu einer Akkumulation ubiquitinylierter Proteine (Cenci et al., 2006; Meister et al., 2007). Die proapoptotische Wirksamkeit von Bortezomib in Myelomzellen korreliert *in vitro* mit der Menge an freigesetzten Immunglobulinen (Meister et al., 2007). In Myelomzellen ist demnach die Schwelle zur Induktion des proapoptotischen UPR bzw. des ER-Stresses nach Proteasomen-inhibition niedriger im Vergleich zu Zellen mit geringerer Antikörpersekretion (Cenci et al., 2006; Meister et al., 2007). Die *workload-capacity* Theorie besagt, dass die Sensitivität von Myelomzellen gegenüber Proteasomeninhibitoren höher ist, je niedriger die Proteasomenaktivität bzw. Proteasomenexpression (*capacity*) ist und je mehr ubiquitinylierte bzw. abzubauende Proteine in der Zelle akkumulieren (*workload*) (Bianchi et al., 2009). Eine *in vitro* Studie in Zelllinien des Multiplen Myeloms zeigte eine höhere Expressionstärke der T-, T_H- und C_H-like Proteasomenuntereinheit in diesen Zellen im Vergleich zu unsensitiven Zellen aus soliden Tumoren (Busse et al., 2008). Neben dieser Theorie konnte auch gezeigt werden, dass abgesehen von einer direkten Wirkung durch Proteasomeninhibition auch posttranslationale Modifikation der Untereinheiten durch Bortezomib die Proteasomenaktivität verringern (Pitcher et al., 2015).

Darüber hinaus wurden im Laufe der Zeit Inhibitoren entwickelt, die eine hohe Selektivität für Untereinheiten des Immunproteasoms aufweisen (Kuhn et al., 2009; Singh et al., 2011). Immunproteasomen werden vorwiegend in Zellen mit hoher Aktivität des Immunsystems, wie z.B. dem Thymus und der Milz exprimiert (Kniepert and Groettrup, 2014). Die Anwendung von Immunproteasom-spezifischen Inhibitoren birgt demnach die Hoffnung auf ein verbessertes Nebenwirkungsprofil durch die erhöhte Selektivität der Wirkstoffklasse. Allerdings zeigen *in vitro* Studien Kreuzresistenzen zwischen einem spezifischen β5i-Inhibitor und Bortezomib (Niewerth et al., 2014b). Außerdem wurde gezeigt, dass in selektiven Konzentrationen keine zytotoxischen Effekte auftraten und nur eine simultane CT- und CT_H-Hemmung zur Apoptose in Multiplen Myelomzellen führt (Niewerth et al., 2014b; Parlati et al., 2009). Es fehlen allerdings bislang Studien, die ein eventuell verbessertes Nebenwirkungsprofil oder effektivere Wirksamkeit durch Einflussnahme auf

die Immunantwort (z.B. IL-6 Freisetzung aus Multiplen Myelomzellen oder Knochenmark-Mikroumgebung) im Kontext des Multiplen Myeloms zeigen. IPSI-001, ein spezifischer Inhibitor der C_i-like Proteasomenuntereinheit, zeigte eine 100-fach geringere zytotoxische Aktivität *in vitro* gegenüber Multiplen Myelomzellen verglichen mit Bortezomib, allerdings war dieser in Bortezomib-resistenten Zelllinien zytotoxisch wirksam (Kuhn et al., 2009).

1.5.1 Bortezomib

Der Borsäure-haltige Proteasomeninhibitor Bortezomib wurde 1998 erstmalig für den therapeutischen Einsatz als Chemotherapeutikum beschrieben (Adams et al., 1998; Adams et al., 1999). In präklinischen Studien zeigte Bortezomib allein einen antiproliferativen, sowie antiapoptotischen Effekt in bereits therapieresistenten Zellen des Multiplen Myeloms, sowie einen Synergismus mit anderen Chemotherapeutika (Hideshima et al., 2001c; LeBlanc et al., 2002; Mitsiades et al., 2003). Nach Veröffentlichung mehrerer klinischer Phase I und II Daten, wie den „CREST“ und „SUMMIT“ Studien, erfolgte 2003 die Zulassung durch die FDA (Jagannath et al., 2004; Kane et al., 2006; Orlowski et al., 2002; Richardson et al., 2003). 2006 wurde Bortezomib von der FDA auch für die Behandlung des Therapie-refraktären Mantelzell-Lymphoms zugelassen (O'Connor et al., 2009). Bortezomib wurde in verschiedenen Phase I und II Studien neben dem Einsatz in hämatologischen auch in soliden Tumoren getestet, allerdings mit geringerer klinischer Wirksamkeit (Denlinger et al., 2014; Gilbert et al., 2013; Kobrinsky et al., 2013; Kumar et al., 2013; Li et al., 2010b; Parma et al., 2012; Schelman et al., 2013; Schenk et al., 2013).

Die Pharmakokinetik nach der Gabe von Bortezomib i.v. wird durch ein Zwei-Kompartimentmodell mit einer schnellen Distribution zu Beginn (Distributions $t_{1/2} < 10$ min) und einem großen Verteilungsvolumen (498-1884 l/m²) beschrieben (Moreau et al., 2008; Papandreou et al., 2004; Schwartz and Davidson, 2004). Die höchste systemische Anreicherung findet sich im Gastrointestinaltrakt und der Leber (Tan et al., 2018). Die Plasmaproteinbindung liegt bei 83 % für Dosierungen zwischen 260 nM-2,6 µM Bortezomib. Die terminale Halbwertszeit variiert interindividuell und liegt zwischen 10-31 h (Moreau et al., 2012; Tan et al., 2018). Vergleichende Studien zwischen der intravenösen (i.v.) und subcutanen (s.c.) Gabe von Bortezomib in Patienten mit rezidivierendem Multiplen Myelom zeigten vergleichbare systemische Exposition bei gleicher Wirksamkeit (Mateos and San Miguel, 2012; Moreau et al., 2012; Moreau et al., 2011; Tan et al., 2018). Lediglich die maximale Plasmakonzentration (C_{max}) war nach s.c. Gabe im Vergleich zur i.v. Applikation reduziert, demnach wird die Wirksamkeit von Bortezomib vorrangig durch die systemische Exposition bestimmt (Moreau et al., 2012). Bortezomib wird vorwiegend über Cytochrom P450 (CYP) 3A4, CYP2C19 und CYP1A2 zu inaktiven deboronierten Metaboliten abgebaut (Pekol et al., 2005; Uttamsingh et al., 2005). Aufgrund der schnellen Distribution von Bortezomib aus dem Plasma in das Gewebe lassen Plasmakonzentrationen keine eindeutige Aussage über die Pharmakodynamik und Wirksamkeit zu. Hierzu werden Daten zur Proteasomeninhibition in Blut, Leukozyten oder Biopsien des Tumors benötigt. Die Inhibition der katalytischen Proteasomenuntereinheiten im Blut ist dosisabhängig, die maximale Inhibition wurde 1 h nach i.v. Bortezomibgabe ermittelt, die sich nach 72 h wieder erholte (Aghajanian et al., 2002; Lightcap et al., 2000; Orlowski et al., 2002). Allerdings deuten Studien darauf hin, dass die Proteasomenhemmung im Blut nicht mit der in malignen Plasmazellen korreliert (Papandreou et al., 2004). Bortezomib bindet spezifisch und reversibel mit unterschiedlicher Bindungsaffinität und Potenz an die drei proteolytischen Untereinheiten des konstitutiven und Immun-Proteasoms (Habib et al., 1989). Hierbei bildet die Borsäuregruppe ein Addukt mit dem Sauerstoff der Threonin und Glycinreste der Proteasomenuntereinheiten (Groll et al., 2006). Die CT und CT_i-like Untereinheit wird wie in **Tabelle 4**

gezeigt, mit der höchsten Potenz in Zellen des Multiplen Myeloms inhibiert (Berkers et al., 2005; Crawford et al., 2006; Ettari et al., 2016). *In vitro* wurde eine 20- bis 40-fach höhere Bortezomib Sensitivität in Zelllinien des Multiplen Myeloms im Vergleich zu Plasmazellen gesunder Probanden bestimmt (Hideshima et al., 2001c).

Tabelle 4: Inhibitorische Potenz (IC₅₀) von Bortezomib auf die katalytisch aktiven konstitutiven und Immun-Proteasomenuntereinheiten (adaptiert nach (Ettari et al., 2016))

Proteasomenuntereinheit	IC ₅₀ [nM]
C-like	74-100
C _i -like	5,5
T-like	1500-4200
T _i -like	940
CT-like	7,0
CT _i -like	3,3

Wie alle Proteasomeninhibitoren beeinflusst Bortezomib viele Signalwege in Zellen des Multiplen Myeloms, die letztendlich zur Apoptose führen (**Abbildung 3**). Einer der Hauptsignalwege ist der des Transkriptionsfaktors NF-κB. Man unterscheidet bei diesem den induzierbaren und intrinsischen Signalweg, die beide durch Proteasomeninhibitoren beeinflusst werden. Die Aktivierung von NF-κB erfolgt beim induzierbaren Signalweg durch die Dissoziation des Proteins *nuclear factor kappa light chain enhancer of activated B cells inhibitor* (IκB), das anschließend durch das Proteasom abgebaut wird (Palombella et al., 1994). Der Transkriptionsfaktor NF-κB. gelangt vom Zytosol in den Nukleus und beeinflusst dort die Transkription verschiedener Gene, die antiapoptotische oder Moleküle der Immunabwehr codieren. Kann IκB nicht abgebaut werden, bleibt dieses an NF-κB gebunden und letzteres in seiner Aktivität gehemmt (Traenckner et al., 1994). In Myelomzellen führt dies zu einer verringerten Expression antiapoptotischer Moleküle (z.B. Caspaseinhibitoren und Bestandteile der DNA-Reparaturmechanismen), Angiogenese-induzierender Faktoren, sowie von Proteine, die Proliferation und Migration der Zellen fördern (Podar et al., 2004; Roccaro et al., 2006). NF-κB spielt auch eine wichtige Rolle bei der Interaktion der Myelomzellen mit dem umgebenden Knochengewebe, so wird die IL-6 Produktion oder die Aktivität der Osteoklasten unter Beteiligung dieses Signalweges reguliert. Sowohl in primären Myelomzellen als auch in MSC von Patienten wurde eine erhöhte basale Aktivität des NF-κB-Signalweges festgestellt (Chauhan et al., 2005). Allerdings ist die Wirkung von Bortezomib nicht allein auf die Beeinflussung des NF-κB-Signalweges zurückzuführen (Hideshima et al., 2002). Durch die eingeschränkte Abbaurate kommt es auch zur Akkumulation proapoptotischer Signalmoleküle wie z.B. BAX, das zur intrinsischen Apoptose führt (Kubiczkova et al., 2014). Die intrinsische Apoptose wird ebenfalls durch eine verstärkte Akkumulation von NOXA, p53 und der verringerten Expression von antiapoptotischen Signalmolekülen verstärkt (Gomez-Bougie et al., 2007; Kubiczkova et al., 2014; Mitsiades et al., 2002; Qin et al., 2005). Neben der intrinsischen Apoptose wird über eine gesteigerte Aktivität der *c-Jun-N-terminal kinase* (JNK), vermittelt über den Rezeptorligand Fas, auch eine extrinsische Apoptose über die sogenannten Todesrezeptoren vermittelt (Mitsiades et al., 2002).

In verschiedenen Studien wurde auch eine Beteiligung anderer Signalwege, wie zum Beispiel der stressinduzierten *heat shock proteins* (HSP), einer erhöhten Expression der c-Jun-NH₂ terminalen Kinase und Einschränkungen der DNA-Reparaturmechanismen gezeigt (Chauhan et al., 2005; Chinault and Blumer, 2003; Mitsiades et al., 2003; Orłowski and Kuhn, 2008). In Zellen des Multiplen Myeloms

wurde neben einem veränderten Membranpotential der Mitochondrien auch eine erhöhte Menge *reaktiver Sauerstoffspezies* (ROS) nachgewiesen (Nerini-Molteni et al., 2008; Orłowski and Kuhn, 2008). Ebenso wurde neben einer basalen Erniedrigung antioxidativer Systeme in Serumproben von Multiplen Myelompatienten auch eine gesteigerte ROS-Synthese infolge des durch Proteasomeninhibitoren verursachten ER-Stresses nachgewiesen (Gangemi et al., 2012; Landowski et al., 2005; Sharma et al., 2009; Smirnova et al., 2014; Spisek et al., 2007).

Abgesehen von der direkten Inhibition der Proteasomen werden auch pleiotrope Effekte von Bortezomib diskutiert. Neben der Beeinflussung des induzierbaren NF- κ B-Signalweges durch die Hemmung des Abbaus von I κ B, konnte gezeigt werden, dass Bortezomib auch genau gegenläufig eine nicht Proteasomen-abhängigen Abbau von I κ B aktiviert, sowie dessen konstitutive Expression verringert (Hideshima et al., 2009; Li et al., 2010a). Darüber hinaus wurde beschrieben, dass die durch Apoptose aktivierten Caspasen das Proteasom zusätzlich inhibieren und so möglicherweise den Effekt von Bortezomib verstärken (Sun et al., 2004). Zusätzlich zeigen neue Studien, dass Bortezomib zu einer Konformationsänderung des Proteasoms führt, welche die inhibitorische Wirkung verstärkt (Pitcher et al., 2015).

Abgesehen von den Effekten auf die malignen Plasmazellen beeinflusst Bortezomib die Zell-Zell-Kontakte von Myelomzellen zu den Zellen der Knochenmark-Mikroumgebung wie z.B. MSC und auch deren Signalwege. Die durch diese Zellinteraktion stimulierte Zytokinausschüttung wird durch Bortezomib vermindert (Hideshima et al., 2001a). Neben der Zell-Zell-Interaktion beeinflusst Bortezomib auch das Osteoblasten-Osteoklasten-Gleichgewicht und damit das Knochen-remodeling (Chauhan et al., 1996). *In vitro* Studien zeigten einen Zusammenhang zwischen Inhibition des Proteasoms und der Differenzierungsfähigkeit von MSC zu Osteoblasten. Die Expression des *bone morphogenic protein 2* (BMP-2) wird durch Proteasomeninhibitoren in Osteoblasten stimuliert und wirkt durch autokrine Mechanismen auf die Differenzierung von MSC (Garrett et al., 2003). Ebenso wurde sowohl in Osteoblasten als auch deren Vorläuferzellen eine erhöhte Aktivität der durch BMP-2 induzierten Transkriptionsfaktoren *runx-related transcription factor 2/ core-binding factor alpha (1)* (Runx2/Cbfa-1) unter niedrigen Bortezomibkonzentrationen festgestellt (Giuliani et al., 2007). *In vitro* wurde eine gesteigerte Matrixmineralisierung der Vorläuferzellen von Osteoblasten auf eine Stabilisierung von β -catenin und des Transkriptionsfaktors TCF zurückgeführt (Qiang et al., 2009). Dieser osteoanabole Effekt wird zusätzlich durch eine niedrigere Expression von DKK-1, einem Antagonisten dieses Signalwegs, unter Bortezomib verstärkt (Accardi et al., 2015; Qiang et al., 2009). Bortezomib wirkt aber nicht nur auf Osteoblasten, sondern hemmt auch die Differenzierung von Osteoklasten (Zavrski et al., 2005). Die Bindung von RANKL an RANK aktiviert den NF- κ B Signalweg und damit die Differenzierung von Osteoklasten, genau dieser Signalweg wird durch die inhibitorische Wirkung von Bortezomib unterbunden. Ebenfalls wird die reduzierte Differenzierungsrate der Osteoklasten mit einer erniedrigten *TNF receptor associated factor 6* (TRAF6) Expression in Zusammenhang gebracht (Hongming and Jian, 2009).

In vitro wurde eine dosis- und zeitabhängige Inhibition der Differenzierung und Aktivität der Osteoklasten und Stimulation der Differenzierung und Aktivität der Osteoblasten nachgewiesen (Giuliani et al., 2007; Kaiser et al., 2013; Mukherjee et al., 2008; Pennisi et al., 2009; Terpos et al., 2006; Zangari and Suva, 2016). Auch die Autophagie-induzierte Apoptose der Osteozyten ist in Zellen des Multiplen Myeloms reduziert (Toscani et al., 2016). Diese Ergebnisse konnten *in vivo* durch eine höhere Zahl von Osteoblasten, reduzierte Osteoklastenzahl und erhöhten Knochenstoffwechsel bestätigt werden (Delforge et al., 2011; Giuliani et al., 2007; Heider et al., 2006; Mohty et al., 2014; Ozaki et al., 2007; Pennisi et al., 2009; Terpos et al., 2010; Terpos et al., 2007; Zangari et al., 2005;

Zangari et al., 2011). In klinischen Studien wurde ebenfalls eine erhöhte Knochendichte, ein verringertes Frakturrisiko und sogar eine Frakturheilung in manchen Patienten unter Kombinationstherapieregimen mit Bortezomib beschrieben (Delforge et al., 2011; Terpos et al., 2010). In anderen Studien konnte dieser Effekt hingegen nicht reproduziert werden (Nifontova et al., 2008; Sezer et al., 2017).

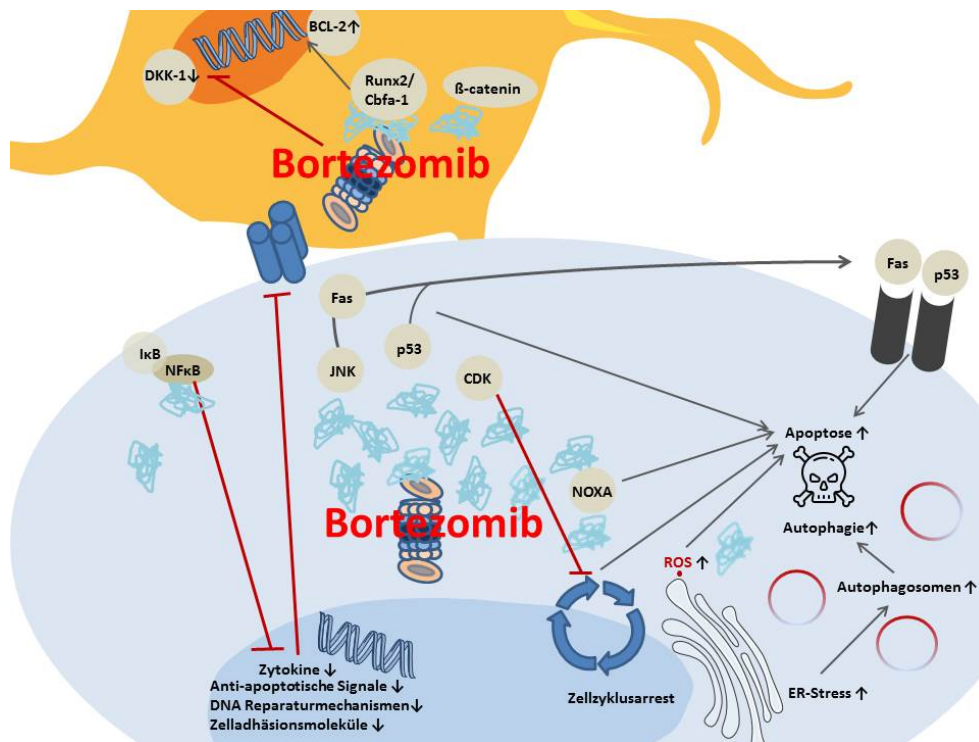


Abbildung 3: Molekulare Wirkmechanismen von Bortezomib in malignen Plasmazellen und mesenchymalen Stromazellen (mesenchymal stroma cells, MSC). Durch Inhibition der proteasomalen Untereinheiten akkumulieren verschiedene abzubauen Proteine in malignen Plasmazellen. (1) *Nuclear factor kappa light chain enhancer of activated B cells inhibitor* (IκB) wird nicht durch den *ubiquitin-proteasome pathway* abgebaut und bleibt an den Transkriptionsfaktor *nuclear factor kappa light chain enhancer of activated B cells* (NFκB) gebunden. Die Translokation des Transkriptionsfaktors in den Zellkern wird unterbunden und Zielgene wie Zytokine, anti-apoptotische Signalmoleküle, DNA-Reparaturenzyme, sowie Zelladhäsionsmoleküle werden nicht transkribiert. (2) *Cyclin-dependant kinases* (CDK) werden nicht abgebaut und führen zum Zellzyklusarrest und ggf. zur Apoptose. (3) Der intrinsische Apoptosemechanismus wird durch die verstärkte Akkumulation und Expression pro-apoptotischer Faktoren, wie p53 und NOXA, aber auch durch eine ER-Stress-bedingte erhöhte Bildung von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) begünstigt. (4) Auch die extrinsische Apoptose über Todesrezeptoren und deren Liganden (z.B. Fas oder p53) wird durch eine Hemmung des Proteinabbaus getriggert. (5) Die Akkumulation einer großen Menge abzubauender Proteine führt zu erhöhtem ER-Stress und damit zu einer erhöhten Autophagierate. Bortezomib reduziert durch eine erniedrigte Zytokinsynthese die Bildung von Zell-Adhäsionsmolekülen. Die Zell-Zell-Interaktion mit den Zellen der Knochenmark-Mikroumgebung wird dadurch erschwert. Unter Bortezomibexposition werden auch osteoanabole Signalwege in MSC begünstigt. (6) Durch Inhibition des Proteinabbaus wird der Transkriptionsfaktor *runt-related transcription factor 2/ core-binding factor alpha* (1) (Runx2/Cbfa-1) nicht degradiert und führt zur erhöhten Expression von *bone morphogenic protein 2* (BMP-2), das zur Differenzierung der MSC beiträgt. (7) Die Matrixmineralisierung der MSC während der Osteoblastogenese wird durch das akkumulierte β-Catenin und reduzierte Expression des Antagonisten *Dickkopf-related protein 1* (DKK-1) begünstigt.

1.5.1.1 Resistenzmechanismen gegenüber Bortezomib

Wie bei den meisten Chemotherapeutika können auch gegenüber Proteasomeninhibitoren Resistenzen auftreten. Studien in zuvor unbehandelten Patienten zeigten lediglich bei 80 % ein

Ansprechen auf Bortezomib, was unter anderem auf intrinsische Resistenzmechanismen, verursacht durch die genetische Variabilität der malignen Plasmazellen sowie epigenetische Veränderungen zurückgeführt werden kann (Chapman et al., 2011; Egan et al., 2012; Jagannath et al., 2005; Lohr et al., 2014; Qiang et al., 2018; Rastgoo et al., 2017). Aber auch erworbene Resistenzen bei therapierefraktären Patienten wurden beobachtet. Mutationen an den Funktionseinheiten des Proteasoms, wie z.B. der CT-like Untereinheit, führten zum Wirksamkeitsverlust von Bortezomib in Zelllinien, aber auch in isolierten Zellen aus Patienten (Barrio et al., 2018; Niewerth et al., 2015; Oerlemans et al., 2008). Posttranslationale Veränderungen am Proteasom bzw. dessen Expression, Zusammensetzung sowie Konformations-änderungen, welche die Bindungsaffinität von Bortezomib beeinflussen, werden ebenfalls in der Literatur diskutiert (Franke et al., 2012; Lu et al., 2008; Oerlemans et al., 2008; Ruckrich et al., 2009; Verbrugge et al., 2012). In einer Studie an resistenten Zelllinien des Multiplen Myeloms wurde gezeigt, dass bei diesen im Vergleich zu Bortezomib sensitiven Zelllinien die Expression des konstitutiven Proteasoms erhöht und die des Immunproteasoms erniedrigt war (Niewerth et al., 2013; Niewerth et al., 2014a).

Durch Proteasomeninhibition werden zelluläre Alternativmechanismen zum Abbau missgefalteter Proteine aktiviert und zugehörige Funktionsproteine verstärkt exprimiert. Ein Beispiel hierfür ist der gesteigerte Abbau von Proteinen durch Aggresomen bzw. Autophagiemechanismen in resistenten Zelllinien (Catley et al., 2006). Ein weiterer Prozess, der bei Blockade des Proteinabbaus über den UPS infolge von Zellstress aktiviert wird, ist die Unterstützung der Proteinfaltungsmechanismen durch eine gesteigerte Expression und Aktivität von HSP und deren zugehörigen Chaperonen (Adomako et al., 2015; Chauhan et al., 2003; Hamouda et al., 2014; Mitsiades et al., 2006). Die HSP können zusätzlich indirekt die konstitutive, proteasomunabhängige Aktivität von NF- κ B begünstigen (Markovina et al., 2008; Mitsiades et al., 2006; Shah et al., 2015). *In vitro* Daten zeigten eine verstärkte Expression von Genen des anti-oxidativen Signalweges, wie z.B. des *proteasome maturation protein* (POMP), die auch wiederum zur Assemblierung von Proteasomen beitragen und somit eine Bortezomibresistenz begünstigen (Li et al., 2015). Die Differenzierung von Plasmazellen wird u.a. durch den Transkriptionsfaktor *X-box binding protein 1* (XBP-1) gesteuert. B-Lymphozyten, die eine hohe Expression aufweisen, werden demnach zu Plasmazellen differenziert, produzieren mehr Immunglobuline und sind damit sensibler gegenüber Bortezomib (Perez-Galan et al., 2011). In XBP-1 negativen malignen Plasmazellen konnte *in vitro* ein Zusammenhang mit der Bortezomibresistenz nachgewiesen werden (Leung-Hagesteijn et al., 2013).

Wie auch bei anderen malignen Erkrankungen wird eine Therapieresistenz durch die Überexpression von Arzneistofftransportern wie P-Glycoprotein (P-gp) diskutiert. Ein Zusammenhang zwischen Expression und Resistenz wurde in Multiplen Myelomzellen bereits gezeigt (Abraham et al., 2015). Bortezomib ist ein P-gp Substrat, induziert jedoch nicht dessen Expression (Clemens et al., 2017). Generell können Arzneistofftransporter die Pharmakokinetik von Bortezomib beeinflussen und somit auch dessen intrazelluläre Konzentration. Ob jedoch die intrazelluläre Konzentration die Wirksamkeit von Bortezomib bestimmt, ist bisher noch nicht abschließend geklärt. In klinischen Studien konnte bisher kein Zusammenhang zwischen der P-gp Überexpression und der Resistenz gegenüber Bortezomib gezeigt werden (Niewerth et al., 2015).

Dennoch gilt es zu beachten, dass viele der *in vitro* untersuchten erworbenen Resistenzmechanismen unter lang anhaltender Bortezomibexposition auftraten, somit möglicherweise nicht die klinischen Bedingungen der Therapie reflektieren und deshalb nicht mit *in vivo* Daten zu untermauern sind (Niewerth et al., 2015).

Neben den intrazellulären Resistenzmechanismen können auch Veränderung bzw. Zell-Zell-Kontakte der Knochenmark-Mikroumgebung die Sensitivität der Myelomzellen gegenüber Bortezomib

beeinflussen (Murray et al., 2014). Zell-Zell-Kontakte über Integrine zwischen den malignen Plasmazellen und den umgebenden Zellen der Knochenische führen zur sogenannten *cell adhesion mediated drug resistance* (CAM-DR) (Damiano et al., 1999; Meads et al., 2008; Nefedova et al., 2003; Schmidmaier et al., 2006). Zellen der Knochenmark-Mikroumgebung exprimieren und sezernieren auch lösliche Faktoren, wie IGF-1, das auch in Bortezomib-resistenten Zelllinien konstitutiv erhöht ist und die Resistenz gegenüber Bortezomib begünstigt (Chiron et al., 2013; De Bruyne et al., 2010; Kuhn et al., 2012). Ein anderer wichtiger Faktor bei der Entstehung von Bortezomibresistenzen ist IL-6, das durch die umgebenden Stromazellen verstärkt freigesetzt wird und somit die intrazelluläre Inhibition von IL-6 durch Bortezomib in Multiplen Myelomzellen umgeht (Hao et al., 2011; Voorhees et al., 2007). Diese und andere löslichen Faktoren wirken zum einen proliferationsfördernd auf die Multiplen Myelomzellen, zum anderen aktivieren sie molekulare Mechanismen, die zu einer Resistenz beitragen (Robak et al., 2018). Darüber hinaus kann die Expression von miRNAs in malignen Plasmazellen durch umgebende MSC über Zell-Zell Signale über Exosomen moduliert werden (Abdi et al., 2016; Wang et al., 2014).

1.5.1.2 Unerwünschte Nebenwirkungen von Bortezomib

Neben den erwünschten Wirkungen von Bortezomib sind vor allem gastrointestinale Beschwerden, Anämie, Thrombozytopenie und periphere Neutropathien bekannte unerwünschte Nebenwirkungen (Cavaletti and Jakubowiak, 2010; Delforge et al., 2010; Meregalli, 2015; Richardson et al., 2006; San Miguel et al., 2006). Die periphere Neuropathie entsteht als Effekt der kumulativen Dosis durch die Therapiezyklen (Cavaletti and Jakubowiak, 2010). Sie manifestiert sich vor allem in den äußeren Extremitäten (Stratogianni et al., 2012). Mechanistisch werden *off-target* Effekte von Bortezomib an Neuronen-spezifischen Proteasen diskutiert, die auch erklären würden, warum diese unerwünschte Nebenwirkung seltener bei anderen Proteasomeninhibitoren auftritt (Arastu-Kapur et al., 2011). Die periphere Neuropathie ist in den meisten Fällen die Nebenwirkung, die zu einer Non-Compliance von Patienten führt oder eine Dosisanpassung erforderlich macht (Dimopoulos et al., 2011; Richardson et al., 2009). Ein erhöhtes Risiko für das Entstehen einer Polyneuropathie haben Patienten mit einer Neuropathie in der Vorgeschichte, sowie anderer Komorbiditäten wie z.B. Diabetes (Lanzani et al., 2008; Meregalli, 2015). Eine Reduktion der peripheren Neuropathie wurde durch ein verlängertes Dosierungsintervall auf eine einmal wöchentliche Gabe oder eine s.c. Verabreichung von Bortezomib bei gleicher systemischer Exposition und Wirksamkeit erreicht (Mateos and San Miguel, 2012; Moreau et al., 2012; Moreau et al., 2011; Petrucci et al., 2014; Tan et al., 2018). Ein Zusammenhang zwischen dem Auftreten der unerwünschten Nebenwirkungen und pharmakokinetischen Parametern C_{max} oder AUC konnten bisher nicht durch Studien belegt werden. Des Weiteren ist auch über die zu Grunde liegenden Mechanismen wenig bekannt (Meregalli, 2015).

Toxische Effekte von Bortezomib auf das hämatologische System wurden in Form von Thrombozytopenien und Neutropenien in klinischen Studien beschrieben (Gallerani et al., 2013; Lonial et al., 2005; Siegel et al., 2012). Mechanistisch wird für die Thrombozytopenie zum einen eine durch den Proteasomeninhibitor induzierte Inhibition der Bildung von reifen Thrombozyten aus Megakaryozyten, zum anderen der Einfluss der Proteasomenaktivität als Lebenszeit-bestimmender Parameter von Thrombozyten diskutiert (Murai et al., 2014; Nayak et al., 2013; Shi et al., 2014).

1.5.2 Bortezomib-freisetzende Knochenersatzwerkstoffe

Im Rahmen des Sonderforschungsbereichs/Transregio 79 „Werkstoffe für die Geweberegeneration im systemisch erkrankten Knochen“ (SFB/TRR 79) wurden abbaubare Knochenersatzwerkstoffe für den Einsatz in Patienten mit Multiplem Myelom entwickelt. Durch Bortezomib-freisetzendes

Knochenersatzmaterial sollte es neben der Verbesserung der biomechanischen Eigenschaften des Knochens auch zu einer Verminderung maligner Plasmazellen in den betreffenden Läsionen kommen.

Nach Chemotherapie in fokalen/osteolytischen Läsionen verbleibende Myelomzellen könnten ursächlich für das Auftreten eines Rezidivs sein und durch lokale Wirkstoffkonzentrationen besser abgetötet werden als dies bei einer systemischen Therapie der Fall ist (unveröffentlichte Daten Hose & Seckinger, mündliche Kommunikation). Im Fall einer Therapieresistenz oder Therapielimitierungen durch auftretende Toxizitäten (z.B. Myelosuppression) könnten wie im Rahmen des SFB/TRR 79 postuliert lokale Therapieformen eine alternative Behandlungsmöglichkeit im Progress darstellen (**Abbildung 4**).

Derzeit verfügbare Materialien, wie der aus Polymethylmethacrylat (PMMA) bestehende Zement sind nicht resorbierbar und können nicht bei einer Regeneration des Knochengewebes integriert werden. Neben den Vorteilen der stabilisierenden Eigenschaft und Möglichkeit zur lokalen Therapie, könnten Wirkstoff-freisetzende Knochenersatzmaterialien die Lebensqualität der Patienten verbessern, die Morbidität und die damit einhergehenden Klinik- oder Ambulanzaufenthalte sowie auf lange Sicht auch die Mortalitätsrate reduzieren.

In Zusammenarbeit mit den Universitäten Gießen und Dresden wurden innerhalb des SFB/TRR 79 Bortezomib-freisetzende Kalziumphosphatzemente (CPC, Keramik) und Xerogele (Verbundwerkstoff aus Biopolymeren und Keramik) entwickelt und *in vitro* sowie *in vivo* in Tiermodellen getestet. Neben den eingebrachten Wirkstoffen haben die Materialien selbst eine osteoanabole Wirkung durch den Einbau von Silikat in das Material. Im Fall der Herstellung der Verbundwerkstoffe wird aus Kollagen und Silikat ein Hydrogel gebildet, das letztendlich unter atmosphärischer Trocknung ein mesoporöses Xerogel bildet, das als Granulat in den Knochen eingebracht wird. Sowohl *in vitro* als auch im Tiermodell *in vivo* zeigte dieses Material eine apoptotische Wirkung gegenüber Myelomzellen, eine Abnahme der Myelomzellinfiltration und einen osteoanabolen Effekt. Ein weiteres neu entwickeltes Wirkstoff-freisetzendes Material stellen mit Maltose-modifizierte-Polyethylenimin(PEI-Mal)-Nanopartikel beladene CPC dar, die Bortezomib ebenfalls über einen längeren Zeitraum freisetzen können. Die Nanopartikel lagern sich nach Freisetzung an die Myelomzellen an und setzen Bortezomib direkt an der Zelle frei. Auch hier konnte *in vitro* eine proapoptotische Wirkung des Materials auf Myelomzelllinien und primäre Myelomzellen nachgewiesen werden.

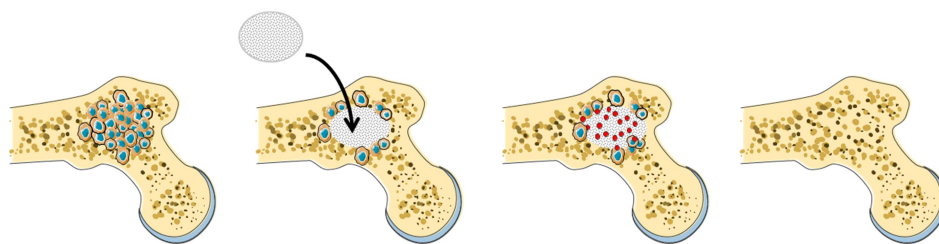


Abbildung 4: Modell des Wirkstoff-freisetzenden Knochenersatzmaterials. (1) Maligne Plasmazellen eines Multiplen Myelompatienten in einem osteolytischen Defekt. (2) Nach Eradikation der Myelomzellen durch eine Chemotherapie wird das Knochenersatzmaterial in die ossäre Läsion eingebracht. (3) Der Wirkstoff wird lokal freigesetzt und wirkt apoptotisch auf verbliebenen malignen Plasmazellen, inhibierend auf die Osteoklasten und osteoanabol. (4) Ausheilung des Knochensubstanzdefekts unter Degradation des biokompatiblen Knochenersatzmaterials.

1.6 Der Endothelin-Signalweg im Kontext des Multiplen Myeloms

Man unterscheidet drei Isoformen des Endothelins: Endothelin-1 (ET-1), Endothelin-2 (ET-2) und Endothelin-3 (ET-3) (Inoue et al., 1989a; Kawanabe and Nauli, 2011; Yanagisawa et al., 1988). Diese aktiven Peptide werden aus Vorstufen, sogenannten pre-pro-Endothelinen unter Beteiligung verschiedener Proteasen und den *endothelin converting enzymes* (ECE-1 und ECE-2) gebildet (Inoue et al., 1989b). Jede dieser Formen bindet mit unterschiedlichen Affinitäten an die beiden G-Protein gekoppelten Rezeptoren Endothelinrezeptor A (ET_A-Rezeptor) und Endothelinrezeptor B (ET_B-Rezeptor) (Hosoda et al., 1991; Sakamoto et al., 1991). Der ET_A-Rezeptor zeigt die höchste Bindungsaffinität für ET-1, wohingegen die Bindungsaffinitäten des ET_B-Rezeptors gegenüber den drei Endothelinen vergleichbar sind. ET-1 wird vor allem in den Gefäßendothelzellen gebildet, wo es seine vasokonstriktive Wirkung durch Bindung an den ET_A-Rezeptor der glatten Muskelzellen vermittelt. Eine gegensätzliche vasodilatierende Wirkung wird durch die Bindung am ET_B-Rezeptor der Endothelzellen hervorgerufen. Endotheline können sowohl parakrin, als auch autokrin wirksam sein.

Der Endothelinsignalweg spielt allerdings nicht nur bei der Regulation des Gefäßtonus eine Rolle, in der Literatur wird auch eine Beteiligung an der Kanzerogenese und dem Progress von Tumoren diskutiert (Bagnato and Spinella, 2003; Rosano et al., 2013). In verschiedenen Tumorentitäten wurden unterschiedliche Expressionsmuster der Endothelinrezeptoren nachgewiesen (Irani et al., 2014b). So konnte u.a. in Gewebeproben von Prostata-, Kolon- und Schilddrüsen-Karzinomen eine erhöhte ET_A-Rezeptor Expression, in Melanom-Gewebeproben eine erhöhte ET_B-Rezeptor Expression und eine Überexpression beider Rezeptortypen in Patientenproben von Blasen- und Vulva-Krebs gezeigt werden (Demunter et al., 2001; Donckier et al., 2007; Egidy et al., 2000; Eltze et al., 2007; Godara et al., 2005; Ishimoto et al., 2012; Wulfing et al., 2005). Ebenfalls wurde in verschiedenen soliden Tumoren auch eine basal erhöhte ET-1 Freisetzung der malignen Zellen gezeigt (Cook et al., 2015; Irani et al., 2014a; Liakou et al., 2012). *In vitro* Studien in verschiedenen Tumorzellen weisen auf eine mögliche Beteiligung an der Zellproliferation hin, die durch Endothelinrezeptor-Antagonisten verringert werden konnte oder sogar zur Apoptose führte (Grant et al., 2007; Ishimoto et al., 2012; Mai et al., 2006; Rosano et al., 2007). Einige Studien zeigen auch einen synergistischen Effekt zwischen klassischen chemotherapeutischen Wirkstoffen und Endothelinrezeptor-Antagonisten *in vitro* und in Tiermodellen (Banerjee et al., 2007; Berger et al., 2006; Rosano et al., 2007; Rosano et al., 2004). Ein Signalweg, der die Angiogenese von Tumoren begünstigt und zur Bildung von VEGF führt, basiert auf der Aktivierung des *hypoxia-inducible factor 1 alpha* (HIF1 α). Dieser kann durch die Bindung von ET-1 an den ET_A-Rezeptor aktiviert werden (Bagnato and Spinella, 2003; Spinella et al., 2014).

Trotz vielversprechendem Einsatz von Endothelinrezeptor-Antagonisten *in vitro* und im Tiermodell, zeigten klinische Studien bislang keine Verbesserung hinsichtlich der Tumorprogression und dem Gesamtüberleben (Carducci et al., 2007; James et al., 2010). Zudem kam es unter der Therapie meist zu schweren unerwünschten Nebenwirkungen, die z.T. auf unspezifische Bindungen der Wirkstoffe zurückzuführen sind. So ist z.B. die durch Bosentan verursachte Lebertoxizität auf die unspezifische Hemmung eines Gallentransporters zurückzuführen (Fattinger et al., 2001). Neben der Beteiligung an verschiedenen Signalwegen, die eine Proliferation, Angiogenese und Metastasierung von Tumoren begünstigen, spielt der Endothelin-Signalweg auch eine wichtige Rolle bei der Knochenbildung (Kristianto et al., 2017). Zum einen kommt es durch die Bindung von ET-1 an den ET_A-Rezeptor von Osteoblasten zur Aktivierung des *wingless and integration-1* (WNT)-Signalwegs und zur niedrigeren Expression von DKK-1, zum anderen konnten ET_A-Rezeptor-Antagonisten die Knochenneubildung in Metastase-Modellen reduzieren (Clines et al., 2007; Nelson et al., 2003; Nelson et al., 1999). ET-1 wirkt demnach dem Knochenabbau entgegen und begünstigt die Metastasierung solider Tumoren.

Im Jahr 2016 wurden erstmals die Effekte von ET-1 auf die Proliferation und Proteasomenaktivität in zwei Zelllinien des Multiplen Myeloms untersucht (Vaïou et al., 2016). In beiden Zelllinien wurde die Expression von ET_A-, ET_B-Rezeptoren und ET-1 nachgewiesen. Es wurde gezeigt, dass ET-1 die Proliferation und Aktivität der Proteasomenuntereinheit in einer Bortezomib-resistenten Zelllinie steigern konnte. Außerdem konnte durch eine gleichzeitige Exposition der Zellen mit Bortezomib und ET-1 die antiproliferative Wirksamkeit von Bortezomib verringert werden. Durch Blockade des ET_B-Rezeptors mittels des spezifischen ET_B-Rezeptor-Antagonisten BQ788 oder *knockdown* mittels *small interfering* RNA (siRNA) wurde in Bortezomib-resistenten Zellen die Wirksamkeit von Bortezomib wieder erhöht. Für die Blockade des ET_A-Rezeptors konnten diese Effekte nicht gezeigt werden.

Diese Daten wurden durch eine Studie untermauert, die zeigte, dass die proliferationsfördernde Wirkung von ET-1 durch selektive ET_A- und ET_B-Rezeptor-Antagonisten (BQ123 und BQ788) aufgehoben werden konnte (Russignan et al., 2017). Es ist daher denkbar, dass die Effektivität der Behandlung mit Bortezomib in Kombination mit Endothelinrezeptor-Antagonisten gesteigert wird.

1.7 Zielsetzung der Arbeit

Bortezomib zeichnet sich vor allem durch seine hohe Spezifität gegenüber malignen Plasmazellen aus. Trotz anhaltender Forschung konnten die intraindividuellen Sensitivitätsunterschiede, wie auch die Mechanismen, die zur Spezifität führen, *in vivo* und *in vitro* nicht abschließend geklärt werden. Eine mögliche Erklärung wäre eine unterschiedliche zelluläre Pharmakokinetik und/oder Pharmakodynamik in verschiedenen Zelltypen oder bei verschiedenen Patienten. In Vorarbeiten konnte erstmals eine massenspektrometrische Methode etabliert werden, um intrazelluläre Bortezomibkonzentrationen in Zelllinien des Multiplen Myeloms zu quantifizieren und mit der Wirksamkeit in Bezug auf Proteasomeninhibition und antiproliferativen Effekt zur korrelieren (Clemens et al., 2014; Clemens et al., 2015; Dettmer et al., 2016). Es wurde gezeigt, dass die intrazelluläre Konzentration in den getesteten Zelllinien nicht mit der Wirksamkeit am *target* oder dem Einfluss auf die Zellviabilität korrelieren. Allerdings konnte eine sehr hohe intrazelluläre Wirkstoffkonzentration und damit intrazelluläre Anreicherung von Bortezomib in allen Zelllinien nachgewiesen werden. Im Gegensatz dazu war bislang unbekannt, welche Wirkstoffkonzentrationen in primären Myelomzellen sowie den Osteoblasten und deren Vorläuferzellen erreicht werden. Gerade im Kontext eines lokal Bortezomib-freisetzenden Knochenersatzmaterials ist es von großer Bedeutung, die intrazelluläre Konzentrationen und mögliche schädlichen Effekte in Osteoblasten und deren Vorläuferzellen zu kennen, um in dem Knochenersatzmaterial die Wirkstoffkonzentrationen festlegen zu können, die keinen apoptotischen Effekt auf diese nicht-malignen Zellen des umgebenden Knochenmarkgewebes haben.

Ziel dieser Arbeit innerhalb des Kooperationsprojektes mit dem Labor für Myelomforschung der Abteilung Innere Medizin V des Universitätsklinikums Heidelberg im SFB/TRR 79 war es daher, intrazelluläre Bortezomibkonzentrationen in primären Myelomzellen, MSC und Osteoblasten zu quantifizieren. Darüber hinaus sollte der Effekt des Wirkstoffs am *target* (Proteasom) und auf die Zellviabilität in Abhängigkeit von der intrazellulären Akkumulation untersucht werden. In Kooperation mit dem Labor für Myelomforschung des Universitätsklinikums Heidelberg wurde untersucht, ob unterschiedliche Expressionsmuster der katalytisch aktiven Proteasomenuntereinheiten mit den zellulären Sensitivitätsunterschieden in Zusammenhang stehen oder einen prognostischen Marker in Bezug auf das ereignisfreie Überleben und des Gesamtüberlebens darstellen. In Anbetracht der Tatsache, dass Bortezomib *in vivo* als Monotherapie

lediglich eine Ansprechrate von 30 % zeigt, wohingegen in Kombinationstherapieregimen (wie z.B. PAd und VMP) Ansprechraten von bis zu 90 % erreicht werden, wurde in dieser Arbeit auch untersucht, ob die Kombination mit weiteren Wirkstoffen zu einer höheren Anreicherung und Wirksamkeit von Bortezomib in Multiplen Myelomzellen führt (Murray et al., 2014; Raab et al., 2009). Ebenso wurde untersucht, ob der Endothelin-Signalweg in Multiplen Myelomzelllinien basal aktiv ist und dessen Antagonisierung durch Bosentan zu einer veränderten Pharmakokinetik oder Pharmakodynamik von Bortezomib führt.

Das Arbeitsprogramm umfasste:

I. Methodenentwicklung und Etablierung:

- Etablierung der Expansion von MSC aus Knochenmarkaspirat gesunder Probanden und Patienten mit therapiepflichtigem unbehandeltem Multiplen Myelom sowie deren Charakterisierung und *in vitro* Differenzierung zu Osteoblasten.
- Adaption und Validierung der etablierten *ultra-performance liquid chromatography* (UPLC) gekoppelt mit Tandem Massenspektrometrie (MS/MS) Methode zur Quantifizierung von Bortezomib in primären Myelomzellen, MSC und Osteoblasten und deren Zellkulturmedien.

II. Vergleich der zelluläre Pharmakokinetik und Pharmakodynamik von Bortezomib in primären Myelomzellen, Zelllinien des Multiplen Myeloms, MSC und Osteoblasten:

- Quantifizierung der intra- und extrazellulären Bortezomibkonzentrationen in primären Myelomzellen, MSC und Osteoblasten von Normal Spendern und Patienten mittels UPLC/MS/MS nach variierender Expositionsdauer mit 5 nM Bortezomib.
- Untersuchung des Konzentrations- und Expositionszeit-abhängigen antiproliferativen Effekts von Bortezomib in Multiplen Myelomzelllinien, MSC und Osteoblasten gesunder Probanden und Patienten mit therapiepflichtigem unbehandeltem Multiplen Myelom.
- Messung der Konzentrations- und Expositionszeit-abhängigen Wirksamkeit von Bortezomib in Bezug auf die Hemmung der katalytischen Aktivität der Proteasomenuntereinheiten in Myelomzelllinien, MSC und Osteoblasten gesunder Probanden und Patienten mit therapiepflichtigem unbehandeltem Multiplen Myelom.

III. Zusammenhang zwischen der Expression von katalytischen Proteasomenuntereinheiten und der zellulären Pharmakokinetik und Pharmakodynamik von Bortezomib in Myelomzelllinien, sowie dem ereignisfreien und Gesamtüberleben von Patienten.

- Quantifizierung der Expression der katalytischen Proteasomenuntereinheiten in Zelllinien des Multiplen Myeloms, normalen und malignen Plasmazellen, MSC und Osteoblasten mittels Genexpressionsanalyse (*gene expression profiling*, GEP).
- Korrelation der Expression der katalytischen Proteasomenuntereinheiten in Zelllinien des Multiplen Myeloms mit der intrazellulären Anreicherung von Bortezomib und dessen Wirksamkeit am Proteasom.
- Zusammenhang zwischen der Expression der katalytischen Proteasomenuntereinheiten in malignen Plasmazellen und dem ereignisfreien und Gesamtüberleben von Myelompatienten.

IV. Vergleich der zellulären Pharmakokinetik und Pharmakodynamik von Bortezomib als Monotherapie und innerhalb der Kombinationstherapieregime PAd und VMP in Zelllinien des Multiplen Myeloms.

- Quantifizierung der intra- und extrazellulären Bortezomibkonzentration nach Exposition mit den Kombinationstherapieregimen PAd und VMP gegenüber der Inkubation mit Bortezomib allein in Myelomzelllinien.
- Vergleich der Konzentrations- und Expositionszeit-abhängigen antiproliferativen und Proteasomen-inhibierenden Wirksamkeit von Bortezomib innerhalb der Kombinationstherapieregimen PAd und VMP gegenüber der alleinigen Exposition mit Bortezomib in Myelomzelllinien.

V. Einfluss des Endothelin-Signalweges auf die Wirksamkeit von Bortezomib in Zelllinien des Multiplen Myeloms.

- Bestimmung der basalen Aktivität des Endothelin-Signalweges durch Expressionsanalyse von ET-1, sowie den ET_A- und ET_B-Rezeptoren in Myelomzelllinien, sowie primären normalen und malignen Plasmazellen.
- Quantifizierung der intra- und extrazellulären Bortezomibkonzentration nach Exposition mit Bortezomib in Kombination mit Bosentan im Vergleich zur Einzelinkubation mit Bortezomib in Multiplen Myelomzelllinien.
- Vergleich der Konzentrations- und Expositionszeit-abhängigen Viabilitätsreduktion durch Bosentan in Kombination mit Bortezomib gegenüber der alleinigen Exposition mit Bortezomib in Zelllinien des Multiplen Myeloms.
- Einfluss von Bosentan allein und in Kombination mit Bortezomib auf die Inhibition der katalytisch aktiven Proteasomenuntereinheiten in Myelomzelllinien.

2. Material und Methoden

2.1 Übersicht der verwendeten Reagenzien, Verbrauchsmaterialien und Geräte

Tabelle 5: Verwendete Reagenzien, Verbrauchsmaterialien und Geräte

Material	Hersteller
2-(N-Morpholino)ethansulfonsäure (MES)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
<i>Absolute QPCR SYBR Green Mix</i>	Roche Applied Science, Mannheim, Deutschland
Aceton ($\geq 99,5\%$)	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Acetonitril (ACN; $\geq 99,5\%$ HPLC Grad)	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
<i>Acquity UPLC Ethylen Bridged Hybrid (BEH)-C18-Säule</i>	Waters, Milford, USA
<i>Acquity UPLC System</i>	Waters, Milford, USA
<i>Affymetrix GeneChip™ Human Genome U133 Plus 2.0 Array</i>	Thermo Fisher, Langenselbold, Deutschland
<i>Alamar Blue® cell viability reagent</i>	Invitrogen by Thermo Scientific, Eugene, USA
<i>Alpha-Minimal Essential Medium (αMEM)</i>	Gibco by Life Technologies, Paisley, UK
Alizarinrot	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
AllPrep DNA/RNA Mini Kits	Qiagen, Hilden, Deutschland
Ameisensäure (UHPLC Optigrade®)	LGC PromoChem, Wessel, Deutschland
Ammoniumpersulfat (APS)	AppliChem, Darmstadt, Deutschland
Anti- β -Actin Antikörper (monoclonal), <i>human anti-rabbit</i> , Klon: AC-74	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
Anti-CD 14 Antikörper, <i>mouse anti human</i> , Fluorescein-Isothiocyanat- (FITC) gekoppelt, Klon: M ϕ P9	Milteny Biotec, Bergisch Gladbach, Deutschland
Anti-CD 19 Antikörper, <i>mouse anti-human</i> , FITC-gekoppelt, Klon: HIB90	Becton Dickinson, San Jose, USA
Anti-CD 34 Antikörper, <i>mouse anti-human</i> , FITC-gekoppelt, Klon: 581	Becton Dickinson (Pharmingen), San Jose, USA
Anti-CD 38 Antikörper, <i>mouse anti-human</i> , FITC-gekoppelt Klon: HIT2	Becton Dickinson, San Jose, USA
Anti-CD 45 Antikörper, <i>mouse anti-human</i> , Phycoerythrin- (PE) gekoppelt, Klon: HI30	Becton Dickinson (Pharmingen), San Jose, USA
Anti-CD 73 Antikörper, <i>mouse anti-human</i> , PE-gekoppelt, Klon: AD2	Becton Dickinson (Pharmingen), San Jose, USA
Anti-CD 90 Antikörper, <i>mouse anti-human</i> , PE-gekoppelt, Klon: 5E10	Becton Dickinson (Pharmingen), San Jose, USA
Anti-CD 105 Antikörper, <i>mouse anti-human</i> , PE-gekoppelt, Klon: SN6	Becton Dickinson (Pharmingen), San Jose, USA
Anti-CD 138 Antikörper, <i>mouse anti-human</i> , PE-	Milteny Biotec, Bergisch Gladbach, Deutschland

gekoppelt, Klon: 44F9	
Anti-CD 138 <i>MicroBeads</i> , human	Milteny Biotec, Bergisch Gladbach, Deutschland
Anti-ET _B -Rezeptor Antikörper (polyclonal), <i>rabbit anti-human</i>	Abcam, Cambridge, UK
Anti-HLA-DR Antikörper (ab117529), <i>mouse anti-human</i> , FITC-gekoppelt, Klon L243	Milteny Biotec, Bergisch Gladbach, Deutschland
Anti-Immunglobulin G (IgG) Antikörper Simultest™ Control $\gamma 1/\gamma 1$, <i>mouse anti-human</i> FITC- und PE-gekoppelt, Klon: X40	Becton Dickinson, Franklin Lakes, New Jersey, USA
Aprotenin	AppliChem, Darmstadt, Deutschland
<i>Aqua purificata</i> (Aqua B. Braun)	B.Braun, Melsungen, Deutschland
<i>Automated magnetic-activated cell sorter (AutoMACS Pro)</i>	Milteny Biotec, Bergisch Gladbach, Deutschland
Auto MACS Laufpuffer	Milteny Biotec, Bergisch Gladbach, Deutschland
β -Glycerophosphat-Di-Natriumsalz-Pentahydrat	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
Bioanalyzer 2100	Agilent, Santa Clara, USA
Biocoll Trennlösung (5 ml)	Biochrom, Berlin, Deutschland
Bortezomib	Selleckchem, München, Deutschland
Bosentan	Carbosynth Limited, Berkshire, UK
BQ123	Santa Cruz Biotechnology, Dallas, USA
BQ788	Alomone Lab, Jerusalem, Israel
Brutschrank Binder CB-E2	Binder, Tuttlingen, Deutschland
Bovines Serumalbumin (BSA)	AppliChem, Darmstadt, Deutschland
CASYblue	Schärfe System, Reutlingen, Deutschland
CASY® Cups	Omni Life Science, Bremen Deutschland
CASYton	Omni Life Science, Bremen Deutschland
CASY® TTC Zellzähler Version 2.2D	Schärfe System, Reutlingen, Deutschland
<i>Cellwash</i>	Becton Dickinson, Franklin Lakes, USA
d8-Bortezomib	Alsachim, Illkirch-Graffenstaden, Frankreich
Dexamethason zur osteogenen Differenzierung (wasserlöslicher Cyclodextrinkomplex)	Sigma- Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
Dexamethason	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
Dimethylsulfoxid (DMSO)	AppliChem, Darmstadt, Deutschland
Doxorubicinhydrochlorid	Biotrend, Wangen, Deutschland
<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i> (DMEM) ohne Phenolrotindikator	Gibco by Life Technologies, Paisley, UK
Durchflusssytometer FACS Calibur mit CellQuest Pro Version 6.0	Becton Dickinson, Franklin Lakes, USA
Durchflusssytometrie-Röhrchen (Polystyren)	Becton Dickinson, Franklin Lakes, USA
<i>ECL™ Prime Western Blotting Kit</i>	Amersham by Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland

Endothelin-1	Abcam, Cambridge, UK
Ethanol (99,8 %)	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Ethidiumbromidlösung (0,07 %)	AppliChem, Darmstadt, Deutschland
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	Life Technologies, Paisley, UK
<i>Fast red</i> TR Salz	Serva, Heidelberg, Deutschland
Fötale Kälberserum (FCS) zur Kultivierung von MSC (FCS MSC)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
FCS	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
FluoroChem	Protein Simple, San Jose, USA
Fluoroscant Ascent Fluorometer	Thermo Scientific, Langenselbold, Deutschland
Formaldehyd (10 %)	Protocol for Thermo Scientific, Langenselbold, Deutschland
<i>GeneElute™ Mammalian Total RNA Miniprep Kit</i>	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
GloMax® 96 Mikroplatten Luminometer	Promega, Madison, WI, USA
Glycerin	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
Glycin	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
Größenmarker zur Proteinbestimmung <i>prestained</i> MBI-Ladder	Fermentas by Thermo Fisher, Waltham, USA
Größenmarker für Nukleinsäuren pUC 19/ <i>MspI</i>	Thermo Scientific, Langenselbold, Deutschland
<i>Hank's Balanced Salt Solution</i> (HBSS)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
Heparin	B. Braun, Melsungen, Deutschland
<i>Hydrophilic-lipophilic balanced N-vinylpyrrolidone-divinylbenzene</i> Harz (HLB) Chromabond Kartusche	Macherey-Nagel, Düren, Deutschland
Indometacin	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
Insulin-Transferrin-Selenium Lösung (ITS Lösung)	Gibco by Life Technologies, Paisley, UK
IL-6 rekombinant hergestellt	R & D Systems, Abingdon, UK
<i>Iscove's Modified Dulbecco's Medium</i> (IMDM)	Life Technologies, Paisley, UK
Isobutylmethylxanthin (IBMX)	Cayman Chemicals, Ann Arbor, USA
Kryo-Einfriergerät, Mr. Frosty, Nalgene®	VWR, Thermo Scientific, Radnor, USA
Kryoröhrchen	Nunc, Wiesbaden, Deutschland
L-Ascorbinsäure-2-Phosphat-Sesquimagnesiumhydrat	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
L-Glutamin 200 mM (GLU)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
Ladepuffer	Fermentas by Thermo Fisher, Waltham, USA
Leupeptin	Biomol, Hamburg, Deutschland
Lichtmikroskop Olympus CK 40	Olympus, Hamburg, Deutschland
LightCycler™480	Roche Applied Science, Mannheim, Deutschland
<i>Low binding</i> Reaktionsgefäß (1,5 ml)	Life Technologies, Paisley, UK
Mastercycler® Gradient	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Mayers Hämalaun	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
Melphalan	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
Mepivacain	AstraZeneca, Wedel, Deutschland

Material und Methoden

Methanol (≥ 99,8 %)	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Methanol UPLC Grad	Biosolve Chemical, Dieuze, Frankreich
Methyl-tert-Butylether (MTBE)	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Multiskan Mikrotiterplattenphotometer RC	Labsystems, Helsinki, Finnland
Mykoplasmen <i>polymerase chain reaction</i> (PCR) Testkit	AppliChem, Darmstadt, Deutschland
Natriumchlorid (NaCl)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
Natrium-Naphtyl-Hydrogenphosphat	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
Natriumthiosulfat	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
Neubauer Zellzählkammer	Meka Glas, Kaufbeuren, Deutschland
<i>Oil Red O</i> Lösung (0,5 % in Isopropanol)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
Optitran BA-S 85 Trägermembran	Schleicher & Schüll by Sigma Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
Paraformaldehyd	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
Pefabloc	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Penicillin Streptomycin (PS, 10000 U/ml; 10 mg/ml)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
Pepstatin	AppliChem, Darmstadt, Deutschland
pH-Meter PB-11	Sartorius, Göttingen, Deutschland
<i>Phosphate buffered saline</i> (PBS) ohne Kalzium- und Magnesium	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
<i>Pierce Bicinchoninsäure</i> (BCA) <i>Protein Assay Kit</i>	Pierce, Rockford, USA
<i>Pierce ECL Western Blotting Substrate</i>	Thermo Fisher, Langenselbold, Deutschland
Prednisolon	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
Primer	Eurofins MWG Operon, Ebersberg, Deutschland
<i>Proteasome-Glo™ C-like assay</i>	Promega, Madison, WI, USA
<i>Proteasome-Glo™ CT-like assay</i>	Promega, Madison, WI, USA
<i>Proteasome-Glo™ T-like assay</i>	Promega, Madison, WI, USA
<i>Quantikine® ELISA Endothelin-1 Immunoassay</i>	R&D Systems, Abingdon, UK
<i>QuantiTect Primer Assay (Hs_EDN1_1_SG)</i>	Qiagen, Hilden, Deutschland
Reaktionsgefäße (0,5 ml, 1 ml, 1,5 ml, 2 ml)	Greiner, Frickenhausen, Deutschland
<i>RevertAid H minus First Strand cDNA Synthese Kits</i>	Fermentas by Thermo Fisher, Waltham, USA
<i>Roswell Park Memorial Institue</i> (RPMI) 1640 Medium	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
Salzsäure 1 M	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Sample buffer	BioRad, Hercules, USA
Schüttler KV2/1500	Noctua GmbH, Mössingen, Deutschland
Schüttler mit Heizfunktion (Thermomixer 5436®)	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Silbernitrat	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
<i>Sodium dodecyl sulfate</i> (SDS)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
Spritze (20 ml, Luer-Lok, zentrisch)	Becton Dickinson, Franklin Lakes, USA
Sterilfilter Miltex-GS (33 mm, Porengröße 22 µm)	Merck Milipore, Tullagreen, Irland
Sterilwerkbank HERAsafe®	Thermo Scientific, Roskilde, Dänemark
Sterilwerkbank Laminar Air Flow KSafety KR	Kojair, Vippula, Finnland

Tetramethylethylenediamine (TEMED)	AppliChem, Darmstadt, Deutschland
Thermomixer Eppendorf	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
<i>Thermo Scientific Absolute qPCR SYBR green Mix</i>	Thermo Scientific, Langenselbold, Deutschland
Türk'sche Lösung	VWR, Thermo Scientific, Radnor, USA
Triple Quadrupol Massenspektrometer (Waters Xevo TQ-S)	Waters, Milford, USA
Tris(hydroxymethyl)-Aminomethan (TRIS)-HCl	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
TRIS Base	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
Triton® X-100	AppliChem, Darmstadt, Deutschland
Trypsin/EDTA (0,25 %/1 mM)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
Tween®-20	AppliChem, Darmstadt, Deutschland
Vakuumabsauganlage	neoLab, Heidelberg, Deutschland
Vortex N2400-6010	Starlab, Hamburg, Deutschland
Wasser (UPLC Gradientengrad)	Biosolve Chemical, Dieuze, Frankreich
Wasserbadschüttler GFL-1083	GFL, Burgwedel, Deutschland
Wippschüttler	VWR International, Darmstadt, Deutschland
Zellkulturflaschen (25, 75 und 175 cm ²)	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
Zellkulturplatte, durchsichtig, 6-Well	Greiner, Frickenhausen, Deutschland
Zellkulturplatte, durchsichtig, 24-Well	Greiner, Frickenhausen, Deutschland
Zellkulturplatte, durchsichtig, 96-Well	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
Zellkulturplatte, weiß, transparenter Deckel, 96-Well	Greiner, Frickenhausen, Deutschland
Zellkulturplatte, weiß, transparenter Boden und Deckel, 96-Well	Greiner, Frickenhausen, Deutschland
Zellschaber	Costar, Corning, Mexiko
Zentrifuge Multifuge L-R	M&S Laborgeräte, Wiesloch, Deutschland
Zentrifuge 2019R	Napco, Unterhaching, Deutschland
Zentrifuge 5415 D	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Zentrifuge 5430 D	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Zellsieb (40 µm und 100 µm, Nylon)	Neolab, Heidelberg, Deutschland
Zentrifugenröhrchen (15 ml, 50 ml)	Greiner, Frickenhausen, Deutschland
Zytotoxizitäts Detektionskit (LDH)	Roche Diagnostics, Mannheim, Deutschland

Tabelle 6: Verwendete Stammlösungen

Stammlösungen	Konzentration	Herstellung
2-Naphtylphosphat Natriumsalz	8,12 mM	10 mg in 5 ml 0,05 M TRIS-Puffer: <i>Aqua purificata</i> (1:3)
Acrylamid		1,5 ml Acrylamid 40 µl Bisacrylamid
Alizarinrot	40 mM	10 mg in 10 ml <i>Aqua purificata</i>
Ascorbinsäure-2-Phosphat	2 mM	5,8 mg in 10 ml <i>Aqua purificata</i>
Bortezomib (Verwendungszweck: Kalibration der	853 µM	3,28 mg Bortezomib in 10 ml ACN/H ₂ O (1:2, v/v) + 0,01 %

Material und Methoden

UPLC/MS/MS Methode, intra- und extrazelluläre Quantifizierung, Bestimmung der Aktivität der Proteasomenuntereinheiten in Abhängigkeit von der Zeit)		Ameisensäure
Bortezomib (Verwendungszweck: Quality Control Standards der UPLC/MS/MS Methode)	1,68 mM	6,64 mg in 10 ml ACN/H ₂ O (1:2, v/v) + 0,01 % Ameisensäure
Bortezomib (Verwendungszweck: Viabilitätsassay, Bestimmung der Aktivität der Proteasomenuntereinheiten in Abhängigkeit von der Konzentration)	30,9 mM	19,9 mg in 1670 µl DMSO
Bosentan	100 mM	100 mg in 1756 µl DMSO
BQ123	7,5 mM	10 mg in 2216 µl DMSO
BQ788	7,5 mM	10 mg in 2075 µl DMSO
β-Glycerophosphat-Di-Natriumsalz-Pentahydrat	500 mM	2,7 g in 25 ml <i>Aqua purificata</i>
d8-Bortezomib		1 mg in 5 ml ACN/H ₂ O (1:2, v/v) + 0,01 % Ameisensäure
Dexamethason	100 µM	15 mg in 25 ml <i>Aqua purificata</i>
Doxorubicin	4,5 mM	26,1 mg in 10 ml <i>Aqua purificata</i>
ET-1	40 µM	100 µg in 1 ml PBS
Fast Red TR Salz	7,78 mM	10,0 mg in 5 ml 0,05 M TRIS-Puffer: <i>Aqua purificata</i> (1:3)
IBMX	25 mM	27,8 mg in 5 ml 96 %-igem Ethanol
Indomethacin	50 mM	89,4 mg in 5 ml 96 %-igem Ethanol
Laufpuffer (10x, pH = 8,3)		30,3 g TRIS 144 g Glycin 10 g SDS Ad 1 l mit <i>Aqua purificata</i>
Lower buffer (pH = 8,8)		18,2 g TRIS 400 mg SDS Ad 100 ml <i>Aqua purificata</i>
Melphalan	10 mM	6,1 mg in 2 ml DMSO
NaCl-MES-Puffer		0,53 g MES 0,88 g NaCl Ad 100 ml <i>Aqua purificata</i>
Natriumthiosulfat	316 µM	2,5 mg in 50 ml <i>Aqua purificata</i>
<i>Oil Red O</i>	1,22 mM	500 mg <i>Oil Red O</i> in 100 ml 99 %-igem Isopropanol
Paraformaldehyd	4 %	20 g Paraformaldehyd in 500 ml PBS (60 °C)

Material und Methoden

Prednisolon	10 mM	18 mg in 5 ml DMSO
Quantikine® Waschlösung		16 ml 25 x Waschpufferlösung 384 ml <i>Aqua purificata</i>
Quantikine® Substratlösung		10 ml Substratlösung A 10 ml Substratlösung B
Quantikine® calibrator diluent		5 ml calibrator diluent 20 ml <i>Aqua purificata</i>
RevertAid H Mastermix		4 µl Transcription RT reaction buffer 5 x 2 µl dNTP 1 µl RNase Inhibitor 1 µl Transc. Reverse Transkriptase
SDS-Probenpuffer (4x, pH = 6,8)		800 µl Sample buffer 200 µl 1M DTT
Silbernitrat	29,4 mM	250 mg in 5,00 ml <i>Aqua purificata</i>
Transferpuffer (10x, pH = 8,2-8,4)		30,3 g TRIS 144 g Glycin ad 1 l mit <i>Aqua purificata</i> ➔ Zur 1x Verdünnung: 100 ml 10x Transferpuffer 200 ml Methanol 700 ml <i>Aqua purificata</i>
TRIS Puffer	0,05 M	6,06 g TRIS-HCl 1,39 g TRIS Base 1 l <i>Aqua purificata</i>
Upper buffer (pH = 6,8)		6,06 g TRIS 400 mg SDS Ad 100 ml <i>Aqua purificata</i>
Waschpuffer (10 x, pH = 7,6)		81,8 g NaCl 24,2 g TRIS ad 1 l <i>Aqua purificata</i> ➔ Zur 1x Verdünnung: 100 ml 10x Waschpuffer 1 ml Tween®-20 899 ml <i>Aqua purificata</i>

2.2 Probenaufarbeitung

2.2.1 Rekrutierung geeigneter Probanden und Patienten

Im Rahmen dieser Arbeit wurden zwischen August 2015 und April 2018 n = 17 Patienten mit symptomatischem, therapiepflichtigem Multiplem Myelom sowie n = 9 gesunde Spender untersucht. Die Knochenmarkpunktion erfolgte in der Medizinischen Klinik, Abteilung Innere Medizin V, Hämatologie, Onkologie, Rheumatologie des Universitätsklinikums Heidelberg nach ärztlicher Aufklärung und schriftlicher Einwilligung der Probanden bzw. Patienten gemäß der aktuellen Richtlinien des Klinikums sowie der gesetzlichen Anforderungen nach der Deklaration von Helsinki. Die Ethikkommission der Medizinischen Fakultät Heidelberg hat der Studie zugestimmt (Ethikvotum S-152/2010).

2.2.2 Probengewinnung und Plasmazellaufreinigung

2.2.2.1 Knochenmarkpunktion

Die Entnahme erfolgte nach Lokalanästhesie mittels Mepivacain im Bereich der *Spina iliaca posterior superior*. Die Aspiration von 3-5 x 20 ml Knochenmark wurde mit 20 ml Spritzen durchgeführt, die mit jeweils 1 ml Heparin befüllt waren. Die Punktionsnadel wurde dabei innerhalb der gleichen anästhetisierten Region 2-3 x umgesetzt, d.h. über die *Compacta* des Knochens zurückgezogen und anschließend eine weitere Punktion der *Compacta* durchgeführt. Die so erhaltenen Proben wurden durch Invertieren homogenisiert und im Anschluss durch das Labor für Myelomforschung der Abteilung Innere Medizin V zur Isolation von normalen bzw. malignen Plasmazellen und MSC verwendet.

2.2.2.2 Isolation von MSC aus Knochenmarkaspirat

Zur Isolation der in der mononukleären Zellfraktion (MNC) enthaltenen MSC mittels Biocoll Dichtegradientenzentrifugation wurden jeweils 10 ml des Knochenmarkaspirats (1:2) mit IMDM verdünnt und mehrmals invertiert (adaptiert nach (Fuhler et al., 2010; Wagner et al., 2005)). Dieser Ansatz wurde erneut mit 1 x PBS/2 mM EDTA auf ein Volumen von 35 ml aufgefüllt. In einem weiteren Schritt wurde die Probe langsam 15 ml einer vorgelegten Biocoll Trennlösung überschichtet (siehe **Abbildung 5 (A)**). Nach einer Zentrifugation bei 700 g, 30 min bei Raumtemperatur (RT) ohne Bremse wurden die Bestandteile der Probe nach Dichte und Sedimentationsgeschwindigkeit getrennt. Erythrozyten und Granulozyten bilden eine Ablagerung am Boden des Zentrifugenröhrchens, die MNC erscheinen in einer ringartigen Abtrennung an der Phasengrenze (siehe **Abbildung 5 (B)**). Die MNC Fraktionen eines Spenders/Patienten wurden aus den verschiedenen Zentrifugenröhrchen abgenommen, über ein Zellsieb (100 µm) gegeben und gepoolt. Die Probe wurde mit 50 ml PBS/2 mM EDTA aufgefüllt und erneut für 5 min bei 200 g, RT zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet in 1 ml PBS/2 mM EDTA resuspendiert. Eine anschließende Zellzahlbestimmung erfolgte durch das Anfärben einer 1:50 Verdünnung eines 10 µl Probenvolumens mit 490 µl Türk'scher Lösung und Zählung mit Hilfe einer Neubauerzählkammer am Lichtmikroskop. Die Probe wurde anschließend erneut ad 50 ml PBS/2 mM EDTA aufgefüllt und 5 min bei 200 g, RT zentrifugiert. Der Überstand wurde erneut verworfen.



Abbildung 5: Abtrennung der mononukleären Zellfraktion (MNC) mittels mittel Biocoll Dichtegradientenzentrifugation. (A) Übersichten der vorgelegten Biocoll-Separationslösung mit dem in *Iscove's Modified Dupleccos Medium* und *phosphate buffered saline* verdünnten Knochenmarkaspirat. **(B)** Nach erfolgter Zentrifugation erscheinen die MNC als Ring (rote Umrandung) an der Phasengrenze.

1×10^7 der CD138-negativen Zellen, die sogenannte Negativfraktion, wurden zentrifugiert (5 min, 1600 rpm, RT) und nach Verwerfen des Überstandes in 9 ml DMEM + 10 % FCS + 1 % GLU + 1 % PS aufgenommen. Die Zellsuspension wurde anschließend in einer mittleren Zellkulturflasche (75 cm²) in Kultur genommen und für 48 h unter den Zellkulturbedingungen für MSC kultiviert. Aufgrund der für MSC charakteristischen Plastikadhärenz werden diese von anderen Zelltypen durch einen Mediumwechsel mit 9,00 ml frischem Medium abgetrennt (DMEM + 10 % FCS + 1 % GLU + 1 % PS).

2.2.2.3 Plasmazellaufreinigung aus Knochenmarkaspirat

Aus der MNC-Fraktion wurden maligne Plasmazellen anhand des für normale und maligne Plasmazellen charakteristischen Oberflächenantigens CD138 mittels AutoMACS Pro abgetrennt (Chilosi et al., 1999; Dhodapkar et al., 1998). Je 1×10^7 Zellen der Probe wurden in 180 µl MACS Laufpufferlösung resuspendiert und mit 10 µl der anti-CD138 MicroBeads versetzt. Nach einer Inkubation der Probe bei 4 °C über einen Zeitraum von 15 min wurden die Proben über ein Zellsieb (40 µm) gegeben und anschließend ad 50 ml mit MACS-Laufpuffer aufgefüllt. Nach einem weiteren Zentrifugationsschritt (200 g, 5 min bei RT) wurde der Überstand verworfen und die Zellen in 2 ml MACS-Laufpuffer resuspendiert. Nach der Auftrennung mittels Auto MACS wurden die CD138 positive („Positivfraktion“) und CD138 negative („Negativfraktion“) Zellfraktion erhalten. Zur Qualitätskontrolle (QC) wurde eine Probe von 5×10^4 Zellen der Positiv- und Negativfraktion, sowie der unsortierten Gesamtfraktion zunächst durchflusszytometrisch auf ihre Reinheit untersucht. Hierzu wurde die entsprechende Zellmenge mit 4 µl der in **Tabelle 7** aufgeführten, mit einem Fluorophor gekoppelten, Antikörper zur Färbung für 15 min bei 4 °C inkubiert. CD38 ist ein Oberflächenantigen, das vorwiegend auf Leukozyten wie Lymphozyten und natürlichen Killerzellen exprimiert wird (Funaro and Malavasi, 1999).

Tabelle 7: Verwendete Fluorophor-gekoppelte Antikörper zur Bestimmung der Reinheit der unsortierten Gesamtfraktion

Antikörper	Fluoreszenzfarbstoff
IgG/IgG	Control γ 1 FITC/ γ 2a PE
CD38	CD38 FITC
CD138	CD138 PE

Nach Inkubation wurde die Probe kurz gevortext und mit 3 ml *cellwash* befüllt. Nach einer Zentrifugation der Proben für 5 min (200 g, RT) wurde der Überstand verworfen und das verbleibende Pellet in 200 μ l *cellwash* aufgenommen. Eine Reinheit von ≥ 70 % wurde als Qualitätskriterium definiert. Bei ausreichender Zellzahl wurden 5×10^5 Zellen durch Zentrifugation (5 min, 200 g, RT) pelletiert. Nach Abnehmen des Überstandes, wurde das Pellet in 10 ml RPMI 1640 Medium + 10 % FCS + 1 % PS + 1 % GLU + 10 μ g/ml IL-6 aufgenommen.

2.3 Zellkultur

Die Zellkultur erfolgte unter sterilen Bedingungen und aseptischer Arbeitsweise. Die Zellen wurden zur Expansion und Differenzierung in (je nach Anforderung geeigneten) 6-, 24- oder 96-Well-Platten oder 25, 75 oder 175 cm² großen Zellkulturflaschen kultiviert. Die allgemeinen Zellkulturbedingungen (37 °C, 5 % CO₂, 100 % Wasserdampfsättigung) des Brutschrankes waren für alle Zellen gleich.

2.3.1 Zellkulturbedingungen humaner Myelomzelllinien

Neun verschiedene Myelomzelllinien wurden von der Deutschen Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen (Braunschweig, Deutschland) bezogen. Hierbei wurden zwischen teiladhärent wachsenden Zelllinien EJM, KMM-1, LP-1, RPMI-8226, U266 und Suspensionszellen Karpas-620, KMS-12-BM, L363 und OPM-2 unterschieden (Diehl et al., 1978; Hamilton et al., 1990; Katagiri et al., 1985; Matsuoka et al., 1967; Nacheva et al., 1990; Namba et al., 1989; Nilsson et al., 1970; Pegoraro et al., 1989). Das entsprechende Zellkulturmedium wurde mit 10 % FCS, 2 mM GLU, 10 % PS versetzt. Die Kultivierung von LP-1 und EJM Zellen erfolgte in IMDM, wohingegen für die anderen Zelllinien RPMI 1640 Medium verwendet wurde. Ein Mediumwechsel erfolgte regelmäßig alle 3-4 Tage. Zur Passagierung der Zellen bei einem Konfluenzgrad von ca. 90 % wurden die teiladhärenten Zellen mittels Zellschaber von der Zellflasche gelöst und ebenfalls wie die Suspensionszellen nach Zentrifugation (5 min, 4608 g, RT) in frischem Zellkulturmedium aufgenommen. Die Zellen wurden maximal für 90 Tage in Kultur gehalten.

2.3.2 Zellkulturbedingungen primärer Myelomzellen

Primäre Myelomzellen wurden nach der Isolation in 10 ml RPMI 1640 Medium + 10 % FCS + 1 % PS + 1 % GLU + 10 μ g/ml IL-6 aufgenommen. Die Zellen wurden anschließend in 6-Well-Platten mit einer Zelldichte von 1×10^4 in 1 ml Medium ausplattiert und für maximal 48 h kultiviert.

2.3.3 Zellkulturbedingungen MSC

Die aus der Negativfraktion erhaltenen plastikadhärenten Zellen hafteten nach dem ersten Mediumwechsel nach 48 h in kugelförmiger Morphologie am Zellkulturflaschenboden an. Nach 4-6

Tagen bildeten sich spindelförmige charakteristische Zellen aus. Zur Expansion wurden die Zellen in sterilfiltriertem DMEM + 10 % FCS + 1 % GLU + 1 % PS bis zur einer Konfluenz von 80-90 % an der dichtesten Stelle der Flasche kultiviert. Zur Passagierung wurde zunächst das Medium abgenommen, die Zellen mit PBS gespült und mit einem entsprechenden Volumen 0,25 %/1 mM Trypsin/EDTA nach 5 min Inkubation bei 37 °C von der Zellkulturflasche gelöst. Durch Klopfen an den Außenwänden der Zellkulturflasche und anschließender Lichtmikroskopie wurde die Effizienz der Trypsinierung überprüft. Lagen alle Zellen kugelförmig in Trypsin suspendiert vor, wurde zur Neutralisierung der Trypsinwirkung eine entsprechende Mengen des Abstopppmediums (DMEM + 20 % FCS, entsprechend der 5-fachen Menge des zugebenen 0,25 %/1 mM Trypsin/EDTA) zugegeben. Die Zellsuspension wurde in ein Zentrifugenröhrchen überführt und anschließend für 5 min, 4608 g bei RT pelletiert. Das Zellpellet wurde erneut im Zellkulturmedium aufgenommen und nach Zellzählung mittels Casy® TTC ausplattiert. Die MSC wurden in neuen Zellkulturgefäßen mit den in **Tabelle 8** aufgeführten Zelldichten ausgesät. Die Zellen wurden bis Passage 5 in Zellkulturflaschen kultiviert und dann für die Bereitstellung für verschiedene Versuche in 6-, 24- oder 96-Well-Platten ausplattiert. MSC wurden maximal bis zur 6. Passage kultiviert.

Tabelle 8: Ausgesäte Menge mesenchymaler Stromazellen pro entsprechendes Zellkulturgefäß

Zellkulturgefäß	Ausgesäte Zellmenge
6-Well-Platte	5×10^4 - 1×10^5
24-Well-Platte	1×10^4 - $2,5 \times 10^4$
96-Well-Platte	5×10^3 - 1×10^4
Kleine Zellkulturflasche (25 cm ²)	1×10^4 - 1×10^5
Mittlere Zellkulturflasche (75 cm ²)	1×10^5 - 7×10^5
Große Zellkulturflasche (175 cm ²)	7×10^5 - $1,2 \times 10^6$

2.3.4 Zellkulturbedingungen für die osteogene Differenzierung

Die MSC wurden in Passage 5 zur osteogenen Differenzierung in 6-, 24- oder 96-Well-Platten ausplattiert (siehe **Tabelle 8**). Nach Erreichen einer Konfluenz von 100 % an der dichtesten Stelle, wurde das osteogene Differenzierungsmedium gemäß der Zusammensetzung in **Tabelle 9** zugegeben. Der Mediumwechsel erfolgte alle 3-4 Tage, wobei die sterilfiltrierten Zusätze dem Basismedium für MSC (DMEM + 10 % FCS + 1 % GLU + 1 % PS) aus Stabilitätsgründen bei jedem Mediumwechsel erneut zugesetzt wurden. Die Zellen wurden unter regelmäßiger lichtmikroskopischer Kontrolle der morphologischen Veränderungen maximal 4 Wochen bis zum positiven Nachweis der osteogenen Differenzierung kultiviert. Dies erfolgte durch Prüfung der Aktivität der alkalischen Phosphatase (ALP), Fällung der Ca²⁺ Ionen mittels Alizarinrot S (*alizarin red staining*, ARS) oder Reaktion von Silbernitrat mit den vorhandenen Phosphationen (von Kossa Färbung).

Tabelle 9: Zusammensetzung des osteogenen Differenzierungsmediums

Ansatz bezogen auf 10 ml osteogenes Medium	Substanz	Konzentration im Medium	Konzentration der Stammlösung
8790 µl	DMEM		
200 µl	β-Glycerophosphat	10 mM	500 mM
10 µl	Dexamethason (wasserlöslich)	100 nM	100 µM
1000 µl	Ascorbinsäure-2-Phosphat	0,2 mM	2 mM

2.3.5 Zellkulturbedingungen adipogene Differenzierung

Die MSC wurden analog der osteogenen Differenzierung in einer 6-Well-Platte ausgesät (siehe **Tabelle 8**). Die Zugabe des adipogenen Differenzierungsmediums nach **Tabelle 10** erfolgte bei einer Konfluenz von 100 % an der dichtesten Stelle. Alle 3-4 Tage fand der Mediumwechsel statt. Das Differenzierungsmedium wurde vor jeder Zugabe frisch angesetzt. Der Nachweis der terminalen Differenzierung, erfolgte durch *Oil Red O* Färbung. Die Zellen wurden für maximal 4 Wochen in adipogenem Differenzierungsmedium kultiviert.

Tabelle 10: Zusammensetzung des adipogenen Differenzierungsmediums

Ansatz bezogen auf 10 ml adipogenes Medium	Substanz	Konzentration im Medium	Konzentration der Stammlösung
9610 µl	DMEM		
200 µl	IBMX	500 µM	25 mM
100 µl	Dexamethason (wasserlöslich)	1 µM	100 µM
40 µl	Indomethacin	200 nM	50 mM
50 µl	ITS Lösung	5 µg/ml	0,01 mg/ml

2.3.6 Zellzählung mittels CASY® TTC

Die automatische Zellzählung mittels CASY® TTC beruht auf dem Prinzip eines Kapillarpartikelzählers mit Pulsflächenanalyse. 50 µl einer zu messenden Zellsuspension wurden in 10,0 ml einer isotonischen Pufferlösung (CASYton) gelöst. Die Zellen werden über eine Messkapillare, an der über zwei Platinelektroden eine elektrische Spannung angelegt ist, geleitet. Wenn Zellen das elektrische Feld passieren, entsteht ein Impuls, dessen Anzahl die Zellzahl repräsentiert. Bei dem sogenannten Stromausschlussverfahren korreliert die Höhe des Impulses mit der Zellgröße. Die Bestimmung der Viabilität der Zellen beruht darauf, dass intakte Zellmembranen isolieren und im Gegensatz zu permeabilisierten Membranen der Strom nicht durch die Zelle geleitet wird (Lindl et al., 2005). Bei toten Zellen entspricht der Impuls nicht der Größe der gesamten Zelle, sondern nur noch dem Zellmatrixvolumen, das ungefähr dem Volumen des Zellkerns entspricht. Neben der Gesamtzellzahl [Zellen/ml], der Zellzahl der viablen Zellen [Zellen/ml], dem Zellvolumen [fl], dem Zelldurchmesser [µm] und der Zellviabilität [%] wird zusätzlich der Aggregationsfaktor der gemessenen Probe

ermittelt. Zur Erstellung eines Messprogramms für einen bestimmten Zelltyp wurden $200\ \mu\text{l}$ à 5×10^5 Zellen in PBS mit $800\ \mu\text{l}$ CASYblue, einer gebrauchsfertigen Lösung zur Bestimmung des Zellmatrixvolumens, versetzt. Nach 2 min Inkubationszeit wurden 9 ml CASYton hinzugefügt und die Probe mehrmals durch Invertieren vermischt. Mit Hilfe des CASY® TTC wurde anschließend eine Dreifachmessung von $400\ \mu\text{l}$ Proben durchgeführt. Neben dieser „Totprobe“ wurde auch eine Probe der viablen Zellen ($200\ \mu\text{l}$ Zellprobe + 9,8 ml CASYton) ohne CASYblue durchgeführt. Die Daten wurden in das CASYblue Evaluationsprogramm eingegeben und dort Excel-basiert die optimale Cursorpositionen zur Unterscheidung der Viabilität mittels eines hinterlegten Algorithmus bestimmt (siehe **Abbildung 6**). Hierbei ist das Volumen des Zellkerns für jede Zellart spezifisch. Die Messprogramme für MSC und Osteoblasten wurden aus gepoolten Zellen von $n = 3$ Normalspendern erstellt.

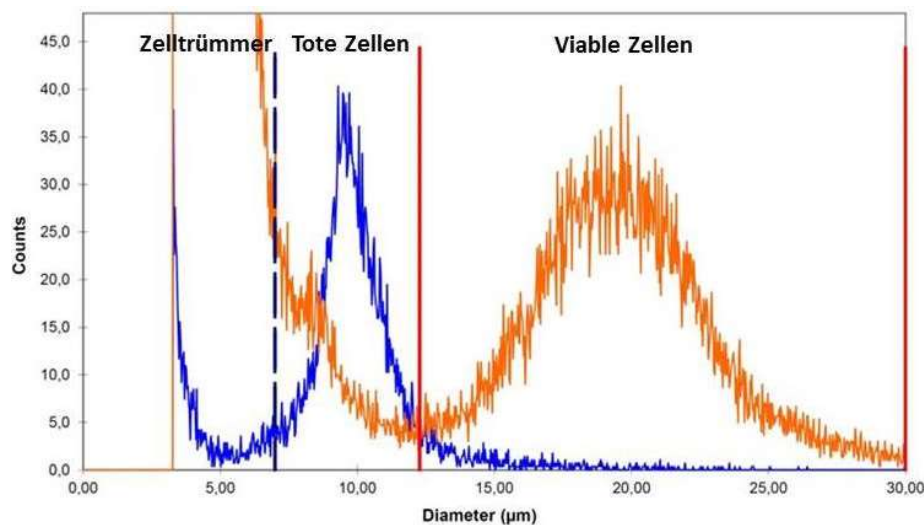


Abbildung 6: Messvorlage des CASY TTC® zur Bestimmung der Gesamtzellzahl [Zellen/ml], der Zellzahl der viablen Zellen [Zellen/ml], dem Zellvolumen [fl], dem Zelldurchmesser [µm] und der Zellviabilität [%] von mesenchymalen Stromazellen. Die Cursorpositionen wurden so berechnet, dass eine eindeutige Unterscheidung der Zelltrümmer, toten Zellen und viablen Zellen möglich ist.

2.3.7 Kryokonservierung und Lagerung

Zur Langzeitlagerung von Zellen wurden diese in DMSO-haltigem Kryomedium in Stickstoff gelagert. Stickstoff hat eine Temperatur von $-196\ ^\circ\text{C}$ und liegt somit unterhalb der Glasübergangstemperatur ($-138\ ^\circ\text{C}$) von Wasser, bei der Eis nicht mehr kristallin sondern amorph vorliegt. Eiskristalle würden die Zellen während der Lagerungen schädigen, was durch diesen Prozess vermieden werden kann. Zur Kryokonservierung der Zelllinien wurden diese wie bei der Zellpassagierung von der Flasche gelöst und auf eine Zellzahl von 8×10^5 bis 2×10^6 Zellen/ml in entsprechendem Medium eingestellt. In einem auf $4\ ^\circ\text{C}$ vorgekühlten, mit 99 %-igem Isopropanol gefüllten Kryo-Einfriergerät (Mr. Frosty) wurden die Kryovials bereits mit 1 ml des Kryomediums (20 % DMSO + 80 % entsprechendes FCS) befüllt. Der Mr. Frosty gewährleistet eine gleichmäßige Temperaturniedrigung von $1\ ^\circ\text{C}/\text{min}$. Die Zellsuspension wurde dem vorgelegten Kryomedium langsam zugetropft. Die Kryovials wurden für 24 h auf $-80\ ^\circ\text{C}$ im Mr. Frosty gelagert und letztendlich in den Stickstofftank zur dauerhaften Lagerung überführt.

Zur Wiederaufnahme der Zellen für die weitere Kultivierung wurden die Kryovials aus dem Stickstofftank entnommen und im $40\ ^\circ\text{C}$ warmen Wasserbad soweit geschmolzen, bis lediglich ein

gefrorener Kern im Vial erkennbar war. Diese Suspension wurde unverzüglich in 25 ml frischem Kulturmedium aufgenommen und zentrifugiert (5 min, 4608 g, bei RT). Durch die Verdünnung des Kulturmediums und der schnellen Abnahme des Zentrifugationsüberstandes können die zytotoxischen Effekte des DMSO beim Auftauen so gering wie möglich gehalten werden. Die Zellen wurden anschließend entsprechend der zuvor eingefrorenen Zellzahl in einer mittleren oder großen Zellkulturflasche kultiviert.

2.3.8 Test auf Infektion der Zellen mit Mykoplasmen

Die Testung der Zellen auf mögliche Infektion mit Mykoplasmen wurde mit Hilfe des Mykoplasmen-PCR Reaktionskits der Firma AppliChem durchgeführt. Es wurde gemäß der Anleitung des Herstellers 1 ml Zellkulturüberstand abpipettiert und zentrifugiert (2 min, 250 g bei RT). Der entstandene Überstand wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt und erneut für 10 min, 20000 g bei RT zentrifugiert. Der Überstand wurde entfernt und das verbleibende Pellet in 50 µl des im Reaktionskit enthaltenen Puffers resuspendiert. Die Probe wurde anschließend für 3 min bei 95 °C inkubiert. Zur Vorbereitung der PCR wurden 5 µl Probe bzw. 1 µl der mitgelieferten Positivkontrolle in 4 µl Wasser mit je 10 µl Reaktionsmix in 35 µl RNase-freiem Wasser angesetzt. Der Reaktionsmix des Herstellers enthält Primer, eine thermostabile DNA-Polymerase, einen RNase Inhibitor, entsprechende Puffer und Desoxyribonukleosidtriphosphate (dNTP). Zur Aktivierung der thermostabilen DNA-Polymerase wurde zunächst im MasterCycler™ in einem 30 s andauernden Schritt die Probe auf 94 °C erhitzt. Zur Amplifizierung wurde erneut 30 s auf 94 °C erhitzt, um die Helixstruktur der DNA aufzulösen. Das Anlagern der Primer, das sogenannte Annealing, geschah bei 60 °C für 120 s. Die Amplifikation des DNA Stranges erfolgt durch die enthaltene Polymerase (72 °C für 5 min). Es wurden 35 Zyklen ausgeführt. Zur Analyse mittels Elektrophorese wurden 20 µl des Produktes zusammen mit 1 µl des 6 x Ladepuffer auf ein 1,5 %-iges Agarosegel + 1 Tropfen Ethidiumbromid/50 ml (in TBE-Puffer, m/V) aufgetragen. Ebenfalls wurde 1 µl des pUC 19/*MspI* Größenmarker zusammen mit 1 µl des 6 x Ladepuffer und 4 µl *Aqua purificata* auf das Gel aufgetragen. Die Trennung erfolgte unter Anlegen von 60 V Spannung für die ersten 5-10 min bzw. 120 V im weiteren Verlauf der Elektrophorese. Das zu erwartende Produkt, die RNA der 16S Ribosomen der Mykoplasmen (rRNA), ist 270 bp groß.

2.4 Charakterisierung von MSC

MSC werden über verschiedene Zelleigenschaften charakterisiert. Im Rahmen dieser Arbeit wurde die MSC-Charakterisierung auf folgende beschriebene Merkmale beschränkt (Dominici et al., 2006):

- positive Oberflächenantigenexpression: CD73, CD90, CD105,
- fehlende Oberflächenantigenexpression: CD14, CD19, CD34, CD45 und HLA-DR,
- plastikadhärentes Wachstum,
- osteogene Differenzierungsfähigkeit,
- adipogene Differenzierungsfähigkeit,
- Expansionsfähigkeit *in vitro*.

Die Charakterisierung der MSC nach den angegebenen Kriterien erfolgte für jede in der Arbeit verwendeten Spender- oder Patientenproben. Jegliches Bildmaterial zur Dokumentation wurden mit einem Iphone 6S und dem Betriebssystem iOS 11.4 aufgenommen.

2.4.1 Durchflusszytometrische Charakterisierung

Zur immunphänotypischen Charakterisierung der MSC mittels Durchflusszytometrie wurden $1-5 \times 10^4$ Zellen in 50 μl PBS in einem Durchflusszytometrie-Röhrchen vorgelegt. Die Zellen wurden für 15 min bei 4 °C unter Ausschluss von Licht mit 4 μl des entsprechenden Fluoreszenzantikörpers gegen CD14, CD19, CD34, CD45, CD73, CD90, CD105, HLA-DR, sowie IgG inkubiert. Nach der Inkubation wurde die Probe mit 3 ml *cellwash* aufgefüllt und 5 min bei 200 g und RT zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen und das verbleibende Pellet in 200 μl PBS resuspendiert und zur Messung verwendet. Die Zellen passieren während der Messung verschiedene Laserstrahlen, durch deren Beugung (*forward scatter*) bzw. Streuung (*side scatter*) das Volumen und die Granularität der Zellen bestimmt werden kann. Diese Eigenschaften der Zellen wurden für jede Probe anhand von ungefärbten Zellen bestimmt, um somit für die fluoreszenzbasierte Messung die richtige Population auszuwählen. Bei den mit FITC- oder PE-gekoppelten Antikörpern werden durch den Einfall der Laserstrahlung Elektronen in einen angeregten Zustand überführt. Die Rückkehr der Elektronen auf das ursprüngliche Energieniveau wird von einem für das Fluorophor charakteristischen Photonenemissionsspektrum begleitet. Die Menge an detektierten Photonen ist dabei proportional zur Menge der exprimierten Oberflächenantigene. Pro Messung wurden 10000 PE- oder FITC-markierte Zellen erfasst. Die Messung erfolgte mittels BD FACSCalibur™ mit der Software BD Cell Quest Pro Version 6.0. Die Auswertung erfolgte mittels der Software FlowJo Version 10.1r5.

2.4.2 Nachweis des osteogenen Differenzierungspotentials

Zum Nachweis des osteogenen Differenzierungspotentials wurden die MSC für 4 Wochen in Differenzierungsmedium in einer 6- bzw. 24-Well-Platte kultiviert. Gleichzeitig wurden zur Kontrollfärbung MSC auf der gleichen Platte mit Medium zur Expansion von MSC versetzt. Zur osteogenen Differenzierbarkeit wurden die in den folgenden drei Kapiteln beschriebenen Nachweismethoden verwendet.

2.4.2.1 Von Kossa Färbung

Bei dieser Fällungsreaktion reagieren die durch Mineralisierung entstehenden Phosphationen der Osteoblasten mit den in dem Reagenz enthaltenen Silberionen unter UV-Lichteinwirkung zu einem dunkelbraunen bis schwarzen Niederschlag (von Kossa, 1901; Clark, 1981). Nach Abpipettieren des Mediums wurde der Zellrasen einmal mit 500 μl PBS gewaschen und anschließend mit 200 μl einer auf -20 °C gelagerten Methanol:Aceton (1:1, V/V) Mischung bedeckt und für 10 min bei -20 °C inkubiert. Nach Abnahme des Fixierungsgemisches und Waschen des Zellrasens mit 500 μl *Aqua purificata* wurde eine 5 %-ige Silbernitratlösung (m/V) auf die Zellen gegeben. Mit geöffnetem Plattendeckel wurde die 24-Well-Platte für 10 min vor einer UV-Lampe inkubiert. Anschließend wurde erneut mit 500 μl PBS gespült und 2 min mit 300 μl einer 5 %-igen Natriumthiosulfatlösung fixiert (m/V). Die Proben wurden am Ende jeder Reaktion zweifach mit 500 μl Leitungswasser gewaschen.

2.4.2.2 ARS

Alizarinrot bildet mit zweiwertigen Kalziumionen charakteristische rote Chelatkomplexe aus. Nach Entfernen des Mediums wurde der Zellrasen mit 500 μl PBS gewaschen, bevor dieser mit 200 μl 10 %-igem Formaldehyd (V/V) für 15 min bei RT fixiert wurde. Nach zweimaligem Waschen mit 500 μl PBS wurden die Zellen mit 200 μl einer 40 mM ARS-Lösung für 20 min unter Schütteln (500 rpm) bei

RT inkubiert. Nach der Inkubationszeit wurde die ARS-Lösung abpipettiert und die Probe viermal mit je 800 µl *Aqua purificata* unter Schütteln gewaschen.

2.4.2.3 Nachweis der ALP

Die ALP ist ein Enzym, dessen Expression bei der Osteogenese gesteigert wird (Robinson und Soames, 1924). Zum Nachweis wurde zunächst das Medium abgenommen und der Zellrasen mit 500 µl PBS gespült, um ihn anschließend mit 200 µl 4 %-igem Paraformaldehyd für 3 min zu fixieren. Nach erfolgreicher Fixierung wurde die Probe erneut dreifach mit 500 µl *Aqua purificata* gewaschen und für 30 min unter Ausschluss von Licht mit einer frisch angesetzten und filtrierten Färbelösung inkubiert. Diese Färbelösung setzt sich in einem 1:2 Mischungsverhältnis aus einer Natrium-Naphtyl-Hydrogenphosphat- und *Fast Red* TR-Salz-Stammlösung zusammen. Nach der Färbung wurde die Probe dreimal mit Leitungswasser gespült.

Bei Bedarf wurden die Zellkerne nach Nachweis der ALP oder der von Kossa-Färbung mit Mayers Hämalan und anschließendem Leitungswasser gegengefärbt und mit einigen Tropfen Glycerin bedeckt. Die Auswertung erfolgte makroskopisch sowie mit Hilfe eines Lichtmikroskops.

2.4.3 Nachweis des adipogenen Differenzierungspotentials

Die adipogene Differenzierung von MSC nach 4 Wochen Inkubation der Zellen in entsprechendem Differenzierungsmedium wurde mittels *Oil Red O*-Färbung nachgewiesen. Simultan wurden MSC auf der gleichen Platte mit MSC-Expansionsmedium versetzt, um eine Kontrolle zu gewährleisten. Für die Färbung wurde zunächst das Medium abpipettiert und die Zellen mit 500 µl PBS gewaschen. Zur Fixierung wurden die Zellen für 3 min in 200 µl 4 %-igem Paraformaldehyd fixiert und anschließend zweimal mit 500 µl *Aqua purificata* gewaschen. Nach 5-minütiger Inkubation mit 200 µl 60 %-igem Isopropanol wurden die Zellen für 15 min bei RT mit der *Oil Red O*-Gebrauchslösung (*Oil Red O*-Stammlösung im Mischungsverhältnis 6:4 mit *Aqua purificata* verdünnt und nach 24 h filtriert) gefärbt. Der lipophile Farbstoff lagert sich in dieser Zeit in die Lipidvakuolen der Zellen ein. Abschließend wurde die Probe kurz mit 60 %-igem Isopropanol differenziert und zweifach mit Leitungswasser gespült.

Eine Gegenfärbung der Zellkerne mit Mayers Hämalan und anschließendem Bläuen mit Leitungswasser wurde bei Bedarf vorgenommen. Die Zellen wurden im Anschluss mit einigen Tropfen Glycerin bedeckt.

2.5 Bortezomibquantifizierung mittels UPLC/MS/MS

Die Aufarbeitung und Messung der Proben wurde im Analytischen Labor der Abteilung Klinische Pharmakologie und Pharmakoepidemiologie durchgeführt. Nach der Extraktion von Bortezomib aus den Probenmatrices durch *liquid-liquid-extraction* (LLE) oder *solid-phase-extraction* (SPE) erfolgte die Quantifizierung von Bortezomib in Zellpellets und Zellkulturüberständen mittels der bereits etabliertem und validierten UPLC/MS/MS-Methode (Clemens et al., 2014). Bei diesem Verfahren wird die Probe in einem Eluentengradienten unter hohem Druck (30 PSI, Flussrate 0,80 ml/min) über die stationäre Phase mit integriertem Filter (Acquity BEH-C18-Säule mit 1,7 µm; 2,1 x 50 mm) unter konstanter Temperatur (40 °C) gepumpt. Die Trennung erfolgt nach dem *reversed phase* Prinzip der Flüssigchromatographie durch verschiedene Wechselwirkungen der Probe mit der mobilen und stationären Phase. Der Eluent setzte sich zu Beginn aus 5 % ACN + 0,01 % Ameisensäure (E1) und 95 % H₂O (UPLC Grade) + 0,01 % Ameisensäure (E2) zusammen. Die Zusammensetzung des Eluenten

wurde zeitabhängig nach Injektion der Probe wie in **Tabelle 11** angegeben variiert (Eluentengradient).

Tabelle 11: Eluentengradient der *ultra-performance liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry* Methode zur Quantifizierung von Bortezomib

Zeit nach Injektion der Probe [min]	Zusammensetzung	Anteil der organischen Phase E1 [%]	Anteil wässrigen Phase E2 [%]
0-0,25	Konstant	5	95
0,25-1	Langsamer Gradient auf	30	70
1-1,5	Konstant	30	70
1,5-1,75	Langsamer Gradient auf	90	10
1,75-2	Langsamer Gradient auf	5	95

Die Retentionszeiten (d8-Bortezomib = 1,32 min und Bortezomib = 1,33 min) der Analytmoleküle ermöglichen eine chromatographische Trennung der Analyten von der Probenmatrix, bevor diese durch Elektrosprayionisation (ESI) in den gasförmigen Zustand überführt und ionisiert werden. Bei diesem Verfahren wird der Eluent mit den enthaltenen Analyten einer Kapillare zugeführt an der eine Spannung (*spray voltage* 1800 V, *Cone voltage* 20 V) anliegt. Durch das elektrische Feld zwischen Kapillare und Gegenelektrode werden die Analyttropfen gleicher Ladung am Ende der Kapillare gesammelt und bilden einen sogenannten Taylor-Konus aus, der an seiner Spitze aufgrund der Coulomb-Abstoßung der Ladungen zu einem Aerosol führt. Das Verdampfen des Eluenten durch das eingeleitete Desolvationsgas (Stickstoff, 600 l/h, Desolvationstemperatur 600 °C) führt letztendlich zum Vorliegen der reinen vorwiegend ionisierten Analytmoleküle. Über die sogenannte *cone* werden diese mittels StepWave™ zum Triple-Quadrupol-System geleitet. Im ersten Quadrupol werden die geladenen Analytionen zunächst in einem elektrischen Feld beschleunigt. Passieren diese dann die Stabelektroden findet eine Trennung nach Masse (m) und Ladung (z) statt. Durch eine voreingestellte Wechselspannung gelangen nur Teilchen mit einem definierten m/z Verhältnis den Quadrupol und werden im Anschluss in einer Stoßkammer durch das enthaltene Kollisionsgas Argon (0,18 ml/min) fragmentiert (*collision induced dissociation*). Diese Fragmente werden im nachgeschalteten zweiten Quadrupol erneut nach einem bestimmten m/z Verhältnis getrennt und letztendlich durch einen Detektor quantifiziert. Die m/z Übergänge der Haupt- zu Fragmentionen wurden mittels *multiple reaction monitoring mode* registriert und eindeutig zugeordnet (m/z = 367 → m/z = 226 bei 18 V für Bortezomib (*quantifier*), m/z = 367 → m/z = 208 bei 28 V für Bortezomib (*qualifier*) und m/z = 375 → m/z = 234 bei 18 V für d8-Bortezomib).

Die etablierte Methode wurde gemäß der geltenden FDA Guideline (FDA, 2018; EMA, 2011) und den darin enthaltenen Angaben zur Genauigkeit (*accuracy*), Präzision (*precision*), Extraktionsraten (*recoveries*) und Robustheit (*robustness*) validiert. Die Parameter wurden in drei unabhängigen Experimenten mit 6 x 4 QC Proben und 8 Kalibrationspunkten erhoben und innerhalb eines Versuches (*within-batch*), als auch im Vergleich unter den Versuchsreihen (*batch-to-batch*).

2.5.1 Bortezomibexposition der Zellen und Probenaufarbeitung

Zur Quantifizierung der intra- und extrazellulären Bortezomibkonzentration nach Inkubation der Zellen mit Bortezomib allein oder in Kombination mit anderen Wirkstoffen (**Tabelle 12**) wurden diese stets mit einer Konzentration von 5 nM Bortezomib exponiert. Diese Konzentration wurde gewählt,

da sie klinisch relevant ist und der mittleren IC_{50} der Zellviabilitätsversuche und Hemmung der CT-like Proteasomenuntereinheit aller getesteten Myelomzelllinien entspricht (Clemens et al., 2015; Dettmer et al., 2016). Die verwendete 854 μ M Stammlösung zur Herstellung der Verdünnung für die Inkubationsexperimente entsprach der für die Kalibration der UPLC/MS/MS Methode verwendeten Wirkstofflösung.

Für die Simulation des Kombinationstherapieregimes PAd *in vitro* wurden 2 μ M Doxorubicin, entsprechend der Plasmakonzentration nach einer i.v. Infusionsrate von 9 mg/m² und 0,3 μ M Dexamethason, übereinstimmend mit einer C_{max} von 126 μ g/l nach einer oralen Einfachgabe von 20 mg (EMA Assessment Report Neofordex, 2014), mit 5 nM Bortezomib kombiniert (Barpe et al., 2010). Die therapeutischen Plasmakonzentrationen *in vivo* bildeten auch die Grundlage zur Wahl der Konzentrationen der Substanzen des VMP Therapieregimes. Die Zellen wurden mit 5 nM Bortezomib, 0,6 μ M Melphalan bezogen auf die C_{max} nach Gabe einer oralen Dosis von 10 mg und 3 μ M Prednisolon entsprechend eines maximalen Plasmaspiegels nach 100 mg oraler Dosierung exponiert (Czock et al., 2005; Sviland et al., 1987). Prednisolon ist der in der Leber gebildete aktive Metabolit des *in vivo* verabreichten Prednison. Prednison wird *in vivo* zu 100 % zu Prednisolon metabolisiert (Frey and Frey, 1990). Die *in vitro* verwendete Prednisolonkonzentration entspricht demnach der C_{max} nach oraler Predisongabe.

Zur Untersuchung des Einflusses der Endothelinrezeptorblockade auf die intrazelluläre Akkumulation wurde 5 nM Bortezomib mit 100 μ M Bosentan, einem unspezifischen Endothelinrezeptorblocker kombiniert.

Die Zellen wurden in 6-Well-Platten, je nach Fragestellung, mit den unterschiedlichen Wirkstoffen unter variierenden Inkubationszeiten exponiert (**Tabelle 12**).

Tabelle 12: Zellart-spezifische Wirkstoffexposition unter Berücksichtigung der Expositionszeit und eingesetzten Zellmenge

Zellart	Wirkstoffexposition	Expositionszeit	Ungefähre Zellzahl pro Pellet
Vorversuch zur intrazellulären Quantifikation von Bortezomib in $< 1 \times 10^6$ Zellen/Pellet	5 nM Bortezomib	10 min, 1 h, 2 h, 4 h, 6 h, 24 h	1×10^4
Primäre Myelomzellen	5 nM Bortezomib	1 h, 4 h, 24 h	5×10^4
MSC	5 nM Bortezomib	10 min, 1 h, 2 h, 4 h, 6 h, 24 h, 48 h	1×10^5
Osteoblasten	5 nM Bortezomib	10 min, 1 h, 2 h, 4 h, 6 h, 24 h, 48 h	1×10^5
Myelomzelllinien	5 nM Bortezomib	10 min, 1 h, 2 h, 4 h, 6 h, 24 h, 48 h	1×10^6
	PAd Therapieregime: 5 nM Bortezomib + 200 nM Doxorubicin + 300 nM	10 min, 1 h, 2 h, 4 h, 6 h, 24 h, 48 h	1×10^6

	Dexamethason		
	VMP Therapieregime: 5 nM Bortezomib + 600 nM Melphalan + 3,1 µM Prednisolon	10 min, 1 h, 2 h, 4 h, 6 h, 24 h, 48 h	1×10^6
	5 nM Bortezomib + 100 µM Bosentan	10 min, 1 h, 2 h, 4 h, 6 h, 24 h, 48 h	1×10^6

In Abhängigkeit vom Zelltyp wurden die Pellets der Proben auf unterschiedliche Weise generiert: Zur Bestimmung der tatsächlichen zugegebenen Bortezomibkonzentration (Soll: 5 nM) wurde in jedem Experiment zweimal 500 µl der Ausgangslösung von Bortezomib in entsprechendem Zellkulturmedium entnommen. Zur Anfertigung der Kalibrierreihe und QC-Proben der extrazellulären Bortezomibquantifizierung mittels UPLC/MS/MS wurde bei jedem Versuchsansatz 15 ml des verwendeten Mediums in ein Zentrifugenröhrchen abgefüllt. Alle Proben wurden bis zur analytischen Aufarbeitung bei -20 °C gelagert.

2.5.1.1 Vorversuch zur intrazellulären Quantifikation von Bortezomib in $< 1 \times 10^6$ Zellen/Pellet

Zur Quantifizierung von Bortezomib in Pellets primärer Zellen $< 1 \times 10^6$ Zellen/Pellet wurde zunächst ein Vorversuch in Multiplen Myelomzellen durchgeführt. Hierzu wurden 1×10^4 Karpas-620 Zellen/ml/Well in einer 6-Well-Platte für 10 min, 1 h, 2 h, 4 h, 6 h und 24 h mit 5 nM Bortezomib haltigem RPMI-8226 1640 + 10 % FCS + 1 % PS + 1 % GLU exponiert. Diese Multiple Myelomzelllinie zeigte in vorangegangenen Experimenten nach Inkubation mit 1 nM Bortezomib die niedrigste mittlere intrazelluläre Maximalkonzentration (22 pM) (Clemens et al., 2015). Die Zellen wurden nach der entsprechenden Inkubationszeit im Well resuspendiert und in ein 2 ml Reaktionsgefäß auf Eis überführt. Die Zellzahl, Zellviabilität, Zellvolumen und Zelldurchmesser wurden mittels CASY® TTC mit dem Messprogramm für Karpas-620 ermittelt. Nach der Zentrifugation der Proben (4 °C, 271 g, für 5 min) wurden 500 µl des Überstandes zur Analyse in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Der Rest des Überstandes wurde verworfen. Das Pellet wurde in 1 ml auf 4 °C vorgekühltem PBS resuspendiert, zentrifugiert (4 °C, 271 g, für 5 min) und anschließend der Überstand nochmals verworfen. Dieser Schritt wurde zum erneuten Waschen wiederholt. Für jeden Inkubationszeitpunkt wurden Triplets der Proben angefertigt. Für die QC-Probe wurde ein Pellet aus 1×10^4 Zellen ohne Bortezomibexposition generiert.

2.5.1.2 Primäre Myelomzellen

Eine Gesamtzahl von 5×10^5 primären Myelomzellen wurden direkt nach der Isolation mit je 10 ml Medium in einer Endkonzentration von 5×10^4 Zellen/ml/Well in einer 6-Well-Platte ausgesät. Die Proben wurden sofort mit 1 ml Bortezomib-haltigem RPMI 1640 + 10 % FCS + 1 % PS + 1 % GLU (10 nM Bortezomib, da 1:2 verdünnt) versetzt. Nach 1 h, 4 h und 24 h Inkubation unter Standardzellkulturbedingungen wurden drei Proben durch Resuspendieren und Überführen der gesamten Zellsuspension in ein 2 ml Reaktionsgefäß direkt auf Eis gestellt. Zur Kontrolle der Zellzahl, Zellviabilität und Ermittlung des Volumens, sowie Durchmesser der Zellen wurden 50 µl der Probe zur Analyse mittels CASY® TTC entnommen. Ein individuelles Messprogramm war aufgrund der limitierten Zellmenge nicht umsetzbar, aus diesem Grund wurden alle primären Myelomzellen mit der Messvorlage für die Myelomzelllinie EJM gemessen. Nach der Zentrifugation der Proben bei 4 °C,

271 g, für 5 min wurden 500 µl des Überstandes zur Analyse entnommen. Der Rest des Überstandes wurde verworfen. Das Pellet wurde in 1 ml auf 4 °C vorgekühltem PBS erneut resuspendiert und zentrifugiert (4 °C, 271 g, für 5 min) und anschließend der Überstand abgenommen. Dieser Schritt wurde zum erneuten Waschen wiederholt. Für jeden Inkubationszeitpunkt wurden Triplets der Proben angefertigt. Für die QC-Probe wurde ein Pellet aus 1×10^4 Zellen ohne Bortezomibexposition generiert.

2.5.1.3 MSC

Zur Ermittlung der Bortezomibakkumulation in MSC wurden für einen Versuchsansatz 5×10^4 bis 1×10^5 Zellen in 1 ml Medium/Well einer 6-Well-Platte ausgesät. Nach den Standardzellkulturbedingungen wurden die MSC bis zu einer Konfluenz von 100 % kultiviert. Das Kulturmedium wurde in jedem Well abgenommen und durch 1 ml/Well einer 5 nM Bortezomiblösung in DMEM + 10 % FCS + 1 % PS + 1 % GLU ersetzt. Nach 10 min, 1 h, 2 h, 4 h, 6 h, 24 h, 48 h Inkubation unter Standardzellkulturbedingungen wurden 500 µl des Überstandes direkt aus dem Well in ein 1,50 ml Reaktionsgefäß überführt. Der restliche Überstand wurde abgenommen und die Proben mit 1 ml auf 4 °C vorgekühltem PBS gewaschen. Zum Ablösen der Zellen vom Boden der Platte wurde nach Entfernen des PBS 500 µl Trypsin/EDTA (0,25 %/1 mM) zugegeben. Nach 5 min Inkubationszeit bei 37 °C wurde zum Abstoppen der Trypsinwirkung 1 ml des Abstopppmediums (DMEM + 20 % FCS, entsprechend der 5-fachen Menge des zugebenen 0,25 %/1 mM Trypsin/EDTA) zugegeben, resuspendiert und in ein 1,5 ml *low binding* Reaktionsgefäß auf Eis überführt. Eine Probe von 50 µl Zellsuspension wurde zur Bestimmung der Zellzahl, Zellviabilität, Durchmesser und Volumen der Zellen in der Probe entnommen und mittels CASY® TTC analysiert. Die Proben wurden anschließend bei 4 °C für 5 min bei 271 g zentrifugiert und der Überstand verworfen. Zur Entfernung möglicher extrazellulärer Bortezomibreste wurde die Probe zweimal mit je 1 ml eiskaltem PBS bei den gleichen Zentrifugationsbedingungen gewaschen. Es wurden mindestens drei Proben pro Inkubationszeitpunkt generiert. Zur Kontrolle wurden zwei unbehandelte Pellets unter gleichem Versuchsablauf angefertigt.

2.5.1.4 Osteoblasten

Analog zur Quantifizierung der intrazellulären Bortezomibanreicherung in MSC wurden zunächst 5×10^4 bis 1×10^5 MSC Zellen/Well bis zu 100 % Konfluenz kultiviert. Die Zellen wurden für 14 Tage mit osteogenem Differenzierungsmedium kultiviert. Nach positivem Nachweis der osteogenen Differenzierung mittels ARS in einem Kontroll-Well wurden die Zellen mit Bortezomib-haltigem Medium (5 nM Bortezomib in DMEM + 10 % FCS + 1 % PS + 1 % GLU) für 10 min, 1 h, 2 h, 4 h, 6 h, 24 h, 48 h exponiert. Zur Bestimmung der extrazellulären Bortezomibkonzentration wurden 500 µl des Zellkulturmediums in ein Reaktionsgefäß überführt. Zur Generierung der Pellets wurde zunächst das verbleibende Medium abpipettiert und 1 ml kaltes PBS zugegeben (4 °C). Die Zellen sind durch die Kalzifizierung bei der Osteoblastogenese nicht mittels Trypsin ablösbar und wurden daher mit einem Zellschaber zunächst vom Plattenboden gelöst. Die Zellen wurden mittels Pipette 10-fach resuspendiert, um die Anzahl der Zellagglomerate zu reduzieren, und anschließend in ein eisgekühltes 1,5 ml *low binding* Reaktionsgefäß überführt. Für die Berechnung der Bortezomibkonzentration relevanten Zellparameter wurden mittels CASY® TTC analysiert. Zunächst wurden die Zellen zu einer besseren Komprimierung der Pellets für 10 min bei 4 °C, 271 g zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet mit 1 ml kaltem PBS (4 °C) versetzt. Die Zellen wurden erneut 5 min bei 271 g, 4 °C zentrifugiert. Nach Verwerfen des Überstandes und

erneutem Hinzufügen von kaltem PBS erfolgte der letzte Zentrifugationsschritt (5 min, 1000 g bei 4 °C. Neben den mit Bortezomib exponierten Zellproben (mindestens $n = 3$ pro Inkubationszeitpunkt) wurde auch mindestens ein Pellet zur QC ohne Bortezomibinkubation generiert.

2.5.1.5 Zelllinien des Multiplen Myeloms

Die im Rahmen dieser Arbeit verwendeten Myelomzelllinien wurden mit einer Zellzahl von 2×10^6 Zellen/Well in einer 6-Well-Platte ausgesät. Für die Versuchsserien mit 5 nM Bortezomib oder den Wirkstoffkombinationen PAd, VMP oder 5 nM Bortezomib mit 100 μM Bosentan (siehe **Tabelle 12**) wurde je 1 ml der doppelt konzentrierten Lösung (1:2 Verdünnung) zur Zellsuspension hinzugegeben. Nach entsprechender Expositionsdauer (10 min, 1 h, 2 h, 4 h, 6 h, 24 h, 48 h) wurden die teiladhärenten Zellen mit einem Zellschaber gelöst und analog zu den Suspensionszellen nach mehrmaligem Resuspendieren wurde je 1 ml der Zellsuspension in ein 1,5 ml *low binding* Reaktionsgefäß auf Eis überführt. Mittels CASY® TTC wurden die Zellparameter der Proben bestimmt. Nach Zentrifugation der Zellsuspension für 5 min, 271 g, 4 °C wurden 500 μl des Überstandes abgenommen und das Pellet unter gleichen Zentrifugationsbedingungen zweimal mit kaltem PBS (4 °C) gewaschen. Für eine Kalibrierreihe und die QC-Proben wurden 30 Pellets aus Zellkultivierung derselben Zellen ohne Bortezomib oder andere Wirkstoffkombination à 1×10^6 Zellen generiert. Für jeden Inkubationszeitpunkt wurden mindestens $n = 3$ Proben generiert.

2.5.2 Standardlösungen der UPLC/MS/MS Methode

Zur Erstellung einer Kalibrierreihe wurde eine 854 μM Bortezomib Stammlösung (in ACN/H₂O (1:1; V/V) + 0,01 %) Ameisensäure verwendet, die gemäß der bekannten Stabilitätsstudien bei -25 °C unter Ausschluss von Licht gelagert wurde (Andre et al., 2005; Clemens et al., 2014). Diese Stammlösung wurde zum einen zur Herstellung der Kalibrationsstandards der UPLC/MS/MS Methode, zum anderen auch zur Inkubation der Zellen zur Quantifizierung der intra- und extrazellulären Bortezomibkonzentration, sowie zur Aktivitätsbestimmung der Proteasomenuntereinheiten unter Bortezomibexposition (1 h, 6 h, 24 h, 48 h) der in der Arbeit beschriebenen Zelltypen verwendet. Zur Kalibrierung wurden 12 Verdünnungen in ACN/H₂O (1:1; V/V) + 0,01 % Ameisensäure (0,5; 1; 2; 5; 10; 20; 80; 200; 500; 750; 1000 und 2500 pg/Probe) aus der Stammlösung hergestellt. Die niedrigste Konzentration von 0,5 pg/Probe (13 pM) entspricht hierbei dem *lower limit of quantification* (LLOQ). Die Kalibriergerade wurde mittels linearer Regression (1/x) berechnet. Für die QC-Verdünnungen wurden eine 1,7 mM Stammlösung eingewogen. Aus dieser Lösung wurden vier QC-Standards erstellt: QC A = 2,05 pg/Probe (53 pM), QC B = 272 pg/Probe (7,08 nM), QC C = 658 pg/Probe (17,1 nM) und QC D = 7,26 pg/Probe (189 pM). Die Kalibrier- und QC-Lösungen wurden bei der Vorbereitung der Überstände und Pelletproben unbehandelten Pellets oder reinem Medium zugesetzt, ebenfalls mittels LLE oder SPE extrahiert und mittels UPLC/MS/MS quantifiziert. Für alle Kalibrierpunkte und QC-Standards wurden Zweifachbestimmungen innerhalb einer Messung durchgeführt. Als *internal Standard* (IS) wurde d8-Bortezomib in einer Konzentration von 200 $\mu\text{g/ml}$ (entspricht 510 μM) zu jeder Probe zugesetzt.

2.5.3 LLE-Methode zur Extraktion von Bortezomib aus Zellpellets und korrespondierendem Zellkulturüberstand

Wie bereits publiziert wurden die Proben bis Mai des Jahres 2018 mittels LLE zur Analyse aufgearbeitet. Hierfür wurden je 100 µl der Zellkulturüberstände, reines Medium, sowie der bei den Experimenten eingesetzten Wirkstofflösung zur Aufarbeitung in ein Reaktionsgefäß überführt (Clemens et al., 2014). Die Proben wurden im Anschluss mit 900 µl 0,1 M HCl, 25 µl IS (d8-Bortezomib) und 25 µl der entsprechenden Kalibrationslösungen, QC oder ACN/H₂O (1:1; V/V) versetzt und für 10 s gevortext. Nach Überführung der Lösung in ein 12 ml Zentrifugenröhrchen wurde zur Extraktion der organischen Bestandteile 5 ml MTBE zugegeben. Nach 15-minütigem Mischen durch Invertieren über Kopf wurden die Proben 10 min, 3000 g, bei RT zentrifugiert. Von dem entstandenen Überstand wurden 4 ml unter konstanter Stickstoffzufuhr eingedampft. Der Rückstand wurde in 100 µl des Eluenten (ACN + 0,01 % Ameisensäure/H₂O + 0,01 % Ameisensäure im Mischungsverhältnis 5/95, V/V) resuspendiert und 5 min gevortext und für 1 min in das Ultraschallbad gegeben. Jeweils 350 µl der Probe wurden in eine 96-Well-Platte überführt und 20 µl durch den Autosampler in das UPLC/MS/MS Gerät injiziert und mit einer Flussrate von 0,80 ml/min über die Chromatographiesäule zur MS/MS geführt.

Zur Aufarbeitung der Pelletproben mit Bortezomib oder unbehandelter Pellets zur Kalibrierung bzw. QC wurden diese ebenfalls mit 900 µl HCl, 25 µl IS, 25 µl ACN/H₂O (1:1, V/V) und außerdem 100 µl H₂O + 0,01 % Ameisensäure versetzt. Die Zellen wurden im Anschluss ebenfalls 10 s gevortext und zur Auflösung der zellulären Struktur für 3 min im Ultraschallbad behandelt. Die weitere Aufarbeitung erfolgte analog zu der bereits für die Zellkulturüberstände beschriebenen Arbeitsweise.

2.5.4 SPE-Methode zur Extraktion von Bortezomib aus Zellpellets und korrespondierendem Zellkulturüberstand

Zur Reduktion von Effekten koeluerender Matrixbestandteile der Proben wurde das Extraktionsverfahren von Bortezomib optimiert und eine SPE-Methode etabliert und validiert. Zur Aufarbeitung der Proben wurden diese mit 900 µl 0,1 M HCl, 25 µl IS (d8-Bortezomib) und 25 µl der entsprechenden Standardlösung bzw. ACN/H₂O (1:1; V/V) versetzt. Die Zellsuspensionen bzw. Lösungen wurden im Anschluss gevortext, für 3 min im Ultraschallbad homogenisiert und 5 min zentrifugiert (3000 g, RT). Zur Extraktion von Bortezomib wurde eine HLB Chromabond Kartusche pro Probe zunächst mit 1 ml 5 %-igen MeOH konditioniert, sowie mit 1 ml 0,10 M HCl gespült, dem Lösungsmittel in dem die eigentliche Probe gelöst ist. Es wurde ein Probevolumen von 1 ml aufgegeben und die Kartusche anschließend mit 1 ml 0,10 M HCl, sowie 5 %-igen MeOH nachgewaschen. Die Elution des Analyten aus dem Sorbens der Kartusche erfolgt im Anschluss mit 1 ml MeOH in ein Glasröhrchen. Die Probe wurde für 30 min unter konstanter Stickstoffzufuhr eingedampft und anschließend in 100 µl des Eluentengemisches (95 % H₂O + 0,01 % Ameisensäure + 5 % ACN mit 0,01 % Ameisensäure) aufgenommen. Nach 5 min vortexen der Proben und 1 min im Ultraschallbad wurden 350 µl in 96-Well-Platte überführt. Es wurden 20 µl der Probe mittels Autosampler zur Analyse mittels UPLC/MS/MS in das Gerät injiziert.

2.5.5 Berechnung der intra- und extrazellulären Bortezomibkonzentration

Die Bestimmung der Konzentration erfolgt über das Verhältnis der Peakflächen zwischen den gemessenen Analyten (Bortezomib *quantifier*: $m/z = 367 \rightarrow m/z = 226$ bei 18 V) und des IS (d8-Bortezomib, $m/z = 375 \rightarrow m/z = 234$ bei 18 V).

Die bereits mittels CASY® TTC bei der Probenvorbereitung erhaltene Zellzahl der lebenden Zellen (mit Ausnahme der Osteoblasten bei denen die Gesamtzellzahl eingerechnet wurde) und mittleres Zellvolumens [fl] ergeben durch Multiplikation das Pelletvolumen [μ l]. Die intrazelluläre Bortezomibkonzentration wurde folgendermaßen berechnet:

$$\text{Intrazelluläre Bortezomibkonzentration } \left[\frac{\text{mol}}{\text{l}} \right] = \frac{\left(\frac{\text{Bortezomibkonzentration } \left[\frac{\text{pg}}{\text{Pellet}} \right]}{\text{Pelletvolumen } [\mu\text{l}]} \right) * 10^6}{384 \left[\frac{\text{g}}{\text{mol}} \right]}$$

Für die extrazelluläre Bortezomibkonzentration wurde folgende Berechnungsgrundlage verwendet:

$$\text{Extrazelluläre Bortezomibkonzentration in } \left[\frac{\text{mol}}{\text{l}} \right] = \frac{\left(\text{Bortezomibkonzentration } \left[\frac{\text{pg}}{100 \mu\text{l}} \right] * 10 \right) * 10^6}{384 \left[\frac{\text{g}}{\text{mol}} \right]}$$

Die Versuche wurden mindestens in Triplikaten ausgeführt und der Mittelwert \pm *Standardabweichung* (SD) zur Berechnung und graphischen Darstellung herangezogen.

Zur Beurteilung der Gesamttakkumulation von Bortezomib über den gesamten Inkubationszeitraum von 48 h wurde für die intrazelluläre Konzentration auch die $\text{AUC}_{0-48\text{h}}$ durch das Integral der Fläche unter der Kurve für die unterschiedlichen Zelltypen berechnet und verglichen.

2.6 Einfluss von Bortezomib auf die Zellviabilität

Die Beeinflussung der Zellviabilität durch verschiedene Konzentrationen von Bortezomib, Doxorubicin, Dexamethason, Melphalan, Prednisolon, BQ123 und BQ788 bzw. Bortezomib innerhalb bestimmter Therapieregime (siehe **Tabelle 13**) wurde mittels alamarBlue® Assay bestimmt. Der im Reaktionsgemisch enthaltene, nicht zytotoxische, zellpermeable Farbstoff Resazurin ist ein Indikator für das Reduktionspotential der Zelle und damit für deren Aktivität der Atmungskette. Das nicht fluoreszierende, blau erscheinende Resazurin wird in viablen Zellen zu Resorufin einem roten, fluoreszierenden Farbstoff reduziert.

Nach entsprechender Inkubationszeit (**Tabelle 13**) wurden unabhängig vom Zelltyp in jedes Well der 96-Well-Platte 10 μ l alamarBlue® Reagenz hinzugefügt. Die Proben wurden anschließend für 3 h bei 37 °C im Brutschrank inkubiert. Die Fluoreszenz wurde bei 544 nm Anregungswellenlänge und 590 nm Emissionswellenlänge mittels Ascent Fluoroskan gemessen. Für jeden Wirkstoff bzw. jede Wirkstoffkombination wurden in mindestens drei unabhängigen Experimenten mit je Octuplets jeder Wirkstoffkonzentration durchgeführt. Die Zellviabilität [%] wurde hierbei folgendermaßen berechnet:

$$\text{Zellviabilität } [\%] = \left(\frac{\text{Fluoreszenz der behandelte Zellen} - \text{Zellen-blank}}{\text{Fluoreszenz unbehandelt Zellen}} \right) * 100$$

Für die Durchführung der Viabilitätsassays wurde eine 31 mM Bortezomibstammlösung verwendet. Die Gebrauchslösungen aller Wirkstoffe wurden auf einen DMSO Anteil < 0.1 % verdünnt, um zytotoxische Effekte durch das Lösungsmittel ausschließen zu können.

2.6.1 Bestimmung der Sensitivität gegenüber Wirkstoffen in Zelllinien des Multiplen Myeloms

Zur Bestimmung der Sensitivität von Myelomzellen gegenüber der in **Tabelle 13** genannten Wirkstoffe als Einzelsubstanz oder im Vergleich zu Kombinationstherapieregimen wurden 1×10^4 Zellen in 50 µl Medium/Well in einer 96-Well-Platte ausgesät. Die erste Spalte der Platte wurde ohne Zellen mit lediglich 100 µl reinem Zellkulturmedium befüllt (Leerwert). Die Zellen wurden für 24 h, 48 h bzw. 5 Tage mit 50 µl Medium mit variierenden Wirkstoffkonzentrationen (zweifach konzentriert, da 1:2 verdünnt) gemäß **Tabelle 13** bei 37 °C unter normalen Zellkulturbedingungen exponiert. Eine Spalte wurde mit 100 µl wirkstofffreiem Medium behandelt, um 100 % viable Zellen als Referenz (Proliferationskontrolle) zu erhalten. Bei einer Inkubation mit Bortezomib innerhalb des PAd- oder VMP-Regimes wurden außerdem Zellen der 96-Well-Platte mit jeweils 0,2 µM Doxorubicin und 0,3 µM Dexamethason, bzw. 0,6 µM Melphalan und 3,1 µM Prednisolon versetztem Medium exponiert, um mögliche Einflüsse der Substanzen in den verwendeten Konzentrationen auf die Zellviabilität auszuschließen. Die Zellviabilität wurde dann wie bereits beschrieben mittels alamarBlue® Assay bestimmt.

Tabelle 13: Verwendete Konzentrationen und Expositionszeiten zur Bestimmung der Sensitivität gegenüber Wirkstoffen in Zelllinien des Multiplen Myeloms

Wirkstoff	Konzentration [µM]	Expositions- dauer
Bortezomib	0,001; 0,002; 0,01; 0,02; 0,10; 0,20; 1; 2; 10	24 h
	0,002; 0,001; 0,002; 0,01; 0,02; 0,1; 0,2; 1; 2; 10	48 h
	0,000005; 0,00001; 0,00005; 0,0001; 0,0005; 0,001; 0,005; 0,01; 0,05; 0,1	5 Tage
Bosentan	0,01-100	48 h
BQ123	0,002-20	48 h
BQ788	0,002-20	48 h
PAd Therapieregime: Bortezomib Doxorubicin Dexamethason	0,001; 0,002; 0,01; 0,02; 0,1; 0,2; 1; 2; 10 + 0,2 + 0,3	24 h
VMP Therapieregime: Bortezomib Melphalan Prednisolon	0,001; 0,002; 0,01; 0,02; 0,1; 0,2; 1; 2; 10 + 0,6 + 3,1	24 h
Bortezomib Bosentan	0,0002; 0,001; 0,002; 0,01; 0,02; 0,10; 0,20; 1; 2; 10 + 100	48 h
Bortezomib BQ123	0,0002; 0,001; 0,002; 0,01; 0,02; 0,1; 0,2; 1; 2; 10 + 100	48 h
Bortezomib	0,0002; 0,001; 0,002; 0,01; 0,02; 0,1; 0,2; 1; 2; 10	48 h

BQ788	+ 100	
Bortezomib	0,0002; 0,001; 0,002; 0,01; 0,02; 0,1; 0,2; 1; 2; 10	48 h
ET-1	+ 0,1	

2.6.2 Bestimmung der Sensitivität gegenüber Bortezomib in MSC

Die MSC wurden in Vorbereitung auf den Assay mit 1×10^4 Zellen/Well in eine 96-Well-Platte ausgesät und bis zu einer Konfluenz von 100 % unter Standardzellkulturbedingungen kultiviert. Die erste Spalte der Platte wurde für die Leerwert-Kontrolle bei der Zellaussat ausgespart. Nach Entfernen des Zellkulturmediums wurden die Zellen mit 100 µl aufsteigenden Konzentrationen Bortezomib (**Tabelle 14**) in DMEM + 10 % FCS + 1 % PS + 1 % GLU versetzt. Die ersten beiden Spalten wurden mit Bortezomib-freiem Kulturmedium versetzt (Leerwert, Proliferationskontrolle).

Tabelle 14: Verwendete Bortezomibkonzentrationen und Expositionszeiten zur Bestimmung der Sensitivität gegenüber Bortezomib in mesenchymalen Stromazellen

Wirkstoff	Konzentration [µM]	Expositions-dauer
Bortezomib	0,01; 0,05; 0,1; 0,5; 1; 5; 10; 50; 100	48 h
	0,000005; 0,00001; 0,00005; 0,0001; 0,0005; 0,001; 0,005; 0,01; 0,05; 0,1	5 Tage

2.6.3 Bestimmung der Sensitivität gegenüber Bortezomib in Osteoblasten

Wie bereits für MSC beschrieben wurden 1×10^4 Zellen/Well in einer 96-Well-Platte ausgesät und kultiviert. Nach Erreichen einer Konfluenz von 100 % wurden die Zellen mit osteogenem Medium versetzt und zwei Wochen bis zur Differenzierung kultiviert. Wie auch die MSC wurden die Osteoblasten nach Entfernen des Differenzierungsmediums mit 100 µl aufsteigenden Konzentrationen Bortezomib (**Tabelle 15**) in DMEM + 10 % FCS + 1 % PS + 1 % GLU exponiert. Die ersten beiden Spalten wurden mit Bortezomib-freiem Kulturmedium versetzt (Leerwert, Proliferationskontrolle).

Tabelle 15: Verwendete Bortezomibkonzentrationen und Expositionszeiten zur Bestimmung der Sensitivität gegenüber Bortezomib in Osteoblasten

Wirkstoff	Konzentration [µM]	Expositions-dauer
Bortezomib	0,01; 0,05; 0,1; 0,5; 1; 5; 10; 50; 100	48 h

2.7 Aktivitätsbestimmung der Proteasomenuntereinheiten

Die Aktivität der CT-, T- und C-like 20 S Proteasomenuntereinheiten wurde mittels ProteasomeGlo™ Assay in den verschiedenen Zellentypen bestimmt. Bei dieser Methode werden an Aminoluciferin

gekoppelte Substrate, die spezifisch für die entsprechenden katalytischen Untereinheiten sind (**Tabelle 16**), proteolytisch durch die Proteasomenunterheiten gespalten. Durch die Enzyme wird Aminoluciferin abgespalten, das durch die im Reaktionsmix enthaltene Ultra-Glo™ rLuciferase unter Adenosintriphosphat (ATP)-, Magnesium- und Sauerstoffverbrauch enzymatisch unter Lumineszenzfreisetzung umgesetzt wird.

Tabelle 16: Proteasomenuntereinheiten-spezifische, an Aminoluciferin gekoppelte Substrate des ProteasomeGlo™ Assay Kits

Proteasomenuntereinheit	Substrat
CT-like	Succinyl-Leucin-Leucin-Valin-Tyrosin (Suc-LLVY)-Aminoluciferin
T-like	Z-Leucin-Arginin-Arginin (Z-LRR)-Aminoluciferin
C-like	Z-Norleucin-Prolin-Norleucin-Aspartat (Z-nLPnLD)-Aminoluciferin

Der entsprechende Reaktionsmix wurde bei RT rekonstituiert und stets nach Angaben des Herstellers für 1 h unter Lichtausschluss bei RT gelagert, bevor dieser verwendet wurde. Wie bereits publiziert kann der FCS-Gehalt des Mediums die Ergebnisse der ProteasomGlo™ Assays verfälschen (Dettmer et al., 2015). Die verwendeten Zellen und Gebrauchslösungen wurden daher in PBS angesetzt. Nach entsprechender Inkubationszeit (**Tabelle 18**) mit dem Wirkstoff wurden die Zellen mit 40 µl des ProteasomeGlo™ Reaktionsmix versetzt und unter Ausschluss von Licht für 20 min unter kontinuierlichem Schütteln (300 rpm) inkubiert. Die mit der Enzymaktivität der Proteasomenuntereinheiten korrelierende Lumineszenz wurde anschließend mit dem GloMax Luminometer (Messprogramm „Steady Glo“) quantifiziert. Für die Wirkstoffe wurden Vierfachbestimmungen jeder Konzentration bzw. Inkubationszeit durchgeführt. Die Aktivität der Proteasomenuntereinheiten [%] wurde hierbei folgendermaßen berechnet:

$$\text{Aktivität der Proteasomenuntereinheit [\%]} = \left(\frac{\text{Lumineszenz der behandelte Zellen-blank}}{\text{Lumineszenz unbehandelter Zellen}} \right) * 100$$

Zur Evaluation der Hemmung der Proteasomenuntereinheiten durch 5 nM Bortezomib in Abhängigkeit von der Inkubationszeit wurde, wie auch bei der Quantifizierung der extra- und intrazellulären Bortezomibkonzentration und der Kalibrierlösung der dafür etablierten UPLC/MS/MS Methode die 854 µM Stammlösung verwendet. Die konzentrationsabhängige Beeinflussung der Proteasomenaktivität wurde hingegen mit der 97 mM Bortezomibstammlösung durchgeführt. Die Gebrauchslösungen aller Wirkstoffe wurden auf einen DMSO Anteil < 0,10 % verdünnt, um Veränderung der Proteasomenaktivität durch den zytotoxischen Effekt des Lösungsmittels auszuschließen.

2.7.1 Bestimmung der Aktivität der Proteasomenuntereinheiten nach Wirkstoffexposition in Zelllinien des Multiplen Myeloms

In Zelllinien des Multiplen Myeloms wurde die Beeinflussung der Aktivität der CT-, T- und C-like Proteasomenuntereinheit nach Inkubation mit den in der **Tabelle 17** aufgeführten Wirkstoffen in Abhängigkeit von der Konzentration untersucht. Hierzu wurden 20 µl einer Zellsuspension (5×10^5 /ml in PBS) pro Well ausgesät und mit 20,0 µl aufsteigenden Wirkstoffkonzentrationen in PBS (1:2, V/V, **Tabelle 17**) für 1 h exponiert. Anschließend wurden 40 µl des entsprechenden ProteasomeGlo™ Reaktionsmix zugegeben und erneut bei RT unter Ausschluss von Licht und unter Schütteln (300 rpm)

für 20 min inkubiert. Die Detektion und anschließende Auswertung der Lumineszenzsignale erfolgte wie bereits beschrieben.

Tabelle 17: Verwendete Konzentrationen und Expositionsdauer zur Bestimmung der Konzentrations-abhängigen Aktivität der Proteasomenuntereinheiten nach Wirkstoffexposition in Zelllinien des Multiplen Myeloms

Wirkstoff	Konzentration [μM]	Expositionsdauer
Bortezomib	0,001; 0,005; 0,01; 0,05; 0,1; 0,5; 1; 5; 10	1 h
Doxorubicin	0,005; 0,01; 0,05; 0,1; 0,5; 1; 5; 10,	1 h
Dexamethason	0,005; 0,01; 0,05; 0,1; 0,5; 1; 5; 10	1 h
Prednisolon	0,005; 0,01; 0,05; 0,1; 0,5; 1; 5; 10	1 h
Melphalan	0,005; 0,01; 0,05; 0,1; 0,5; 1; 5; 10	1 h
Bosentan	0,05; 0,10; 0,50; 1; 5; 10; 50; 100	1 h
PAd Therapieregime: Bortezomib Doxorubicin Dexamethason	0,001; 0,002; 0,01; 0,02; 0,1; 0,2; 1; 2; 10 + 0,2 + 0,3	1 h
VMP Therapieregime: Bortezomib Melphalan Prednisolon	0,001; 0,002; 0,01; 0,02; 0,1; 0,2; 1; 2; 10 + 0,6 + 3,1	1 h
Bortezomib Bosentan	0,005; 0,01; 0,05; 0,1; 0,5; 1; 5; 10, 50, 100 + 100	1 h

Neben der konzentrationsabhängigen Hemmung der Aktivität der Proteasomenuntereinheiten wurde auch die zeitabhängige Beeinflussung der CT-, T- und C-like Proteasomenuntereinheiten durch Wirkstoffe (siehe **Tabelle 18**) untersucht.

Auch hier wurden 20 μl einer Zellsuspension ($5 \times 10^5/\text{ml}$ in PBS) pro Well ausgesät und mit 20 μl einer definierten Wirkstoffkonzentration oder Kombination verschiedener Wirkstoffe in PBS (1:2, V/V, **Tabelle 18**) für 1 h, 6 h, 24 h und 48 h inkubiert. Im Anschluss wurde der Proteasome-Glo™ Assay wie bereits beschrieben durchgeführt.

Tabelle 18: Verwendete Konzentrationen und Expositionsdauer zur Bestimmung der Expositionszeit-abhängigen Aktivität der Proteasomenuntereinheiten nach Wirkstoffexposition in Zelllinien des Multiplen Myeloms

Wirkstoff	Konzentration [μM]	Expositionsdauer
Bortezomib	0,005	1 h, 6 h, 24 h und 48 h
PAd Therapieregime: Bortezomib Doxorubicin	0,005 + 0,2	1 h, 6 h, 24 h und 48 h

Dexamethason	+ 0,3	
VMP		1 h, 6 h, 24 h und 48 h
Therapieregime:	0,005	
Bortezomib	+ 0,6	
Melphalan	+ 3,1	
Prednisolon		

2.7.2 Bestimmung der Aktivität der Proteasomenuntereinheiten nach Bortezomibexposition in MSC

Im Unterschied zu der Durchführung des ProteasomeGlo™ Assays in Zelllinien des Multiplen Myeloms wurden in Vorbereitung auf das Experiment 1×10^4 Zellen/Well in einer weißen 96-Well-Platte ausgesät und bis zu einer Konfluenz von 100 % unter Standardzellkulturbedingungen kultiviert. Die beiden ersten Spalten der Platte wurden für die Leerwert-Kontrollen ausgespart. Die Zellen in der dritten Spalte wurden mit Bortezomib-freiem Kulturmedium versetzt (Proliferationskontrolle). Die Zellen wurden mit 40 µl aufsteigender Bortezomibkonzentrationen oder 5 nM Bortezomiblösung in DMEM + 10 % FCS + 1 % PS + 1 % GLU (siehe **Tabelle 19**) inkubiert. Nach entsprechender Inkubationszeit (siehe **Tabelle 19**) wurde das wirkstoffhaltige Medium entfernt und die Zellen zweimal mit 100 µl PBS gewaschen. Anschließend wurde jedes Well mit 40 µl PBS versetzt. Wie auch bei den Versuchen mit den Zelllinien wurden 40 µl Reaktionsmix zugegeben und 20 min bei RT unter Ausschluss von Licht unter kontinuierlichem Schütteln (300 rpm) inkubiert. Die Auswertung erfolgte wie bereits beschrieben.

Tabelle 19: Verwendete Konzentrationen und Expositionsdauer zur Bestimmung der Konzentrations-abhängigen Aktivität der Proteasomenuntereinheiten nach Wirkstoffexposition in mesenchymalen Stromazellen

Wirkstoff	Konzentration[µM]	Expositionsdauer
Bortezomib	0,01; 0,05; 0,1; 0,5; 1; 5; 10; 50; 100; 500	1 h
	0,005	1 h, 6 h, 24 h und 48 h

2.7.3 Bestimmung der Aktivität der Proteasomenuntereinheiten nach Bortezomibexposition in Osteoblasten

Die Evaluation der konzentrations- und zeitabhängige Beeinflussung der der CT-, T- und C-like Proteasomenuntereinheiten durch Bortezomib in Osteoblasten unterschied sich nur in der Probenvorbereitung von der für Multiple Myelomzelllinien beschriebenen Methode zur Bestimmung in MSC. Zunächst wurden MSC in einer Dichte von 1×10^4 Zellen/Well in einer *white walled* 96-Well-Platte ausgesät und bis zu einer Konfluenz von 100 % unter Standardzellkulturbedingungen kultiviert und anschließend für 14 Tage differenziert. Die beiden ersten Spalten der Platte wurden ebenfalls für die Leerwert Kontrolle ausgespart. Die Zellen in der dritten Spalte wurden mit Bortezomib-freiem Kulturmedium versetzt (Proliferationskontrolle). Die Durchführung und Auswertung des Assays erfolgte analog wie für Zelllinien des Multiplen Myeloms beschrieben.

2.8 Simultaner Versuchsaufbau

Zur Bestimmung des Zusammenhanges zwischen intrazellulärer Bortezomibakkumulation und deren Auswirkung auf die Zellviabilität und Aktivität der Proteasomenuntereinheiten in Abhängigkeit von der Zeit wurde ein simultaner Versuchsaufbau gewählt. Bei dieser Vorgehensweise wurden Zellen einer Zelllinie, Spenders oder Patienten der gleichen Passage bzw. dem gleichem Kulturansatz ausgewählt, um diese zur gleichen Zeit mit den gleichen Wirkstofflösungen zu exponieren. In einem simultanen Versuchsansatz wurden immer folgende Experimente durchgeführt:

- intra- und extrazelluläre Quantifizierung von Bortezomib mittels UPLC/MS/MS
- Bestimmung der Zellviabilität mittels alamarBlue® Assay
- Bestimmung der Aktivität der Proteasomenuntereinheiten mittels ProteasomeGlo™

2.8.1 Intrazelluläre Anreicherung von Bortezomib allein bzw. innerhalb der Kombinationstherapieregime PAd und VMP, sowie Untersuchung der Wirksamkeit von Bortezomib in Bezug auf die Zellviabilität und Proteasomenaktivität in Zelllinien des Multiplen Myeloms innerhalb der Wirkstoffkombinationen

Bei diesen Experimenten wurden Zellen einer Zelllinie gleicher Passage, entweder mit 5 nM Bortezomib-haltigem Medium oder mit PAd- und VMP-haltigem Medium über 48 h exponiert. Wie in **Abbildung 7** gezeigt, wurden ProteasomeGlo™ Assays der drei Proteasomenuntereinheiten zeitgleich mit der Probenahme zur intra- und extrazellulären Bortezomibquantifizierung mittels UPLC/MS/MS nach 1 h, 6 h, 24 h und 48 h Expositionszeit für alle drei getesteten Wirkstoffe bzw. Wirkstoffkombinationen durchgeführt. Die Bestimmung der Zellviabilität erfolgte ebenfalls in paralleler Arbeitsweise nach 24 h Inkubation mittels alamarBlue® Assay.

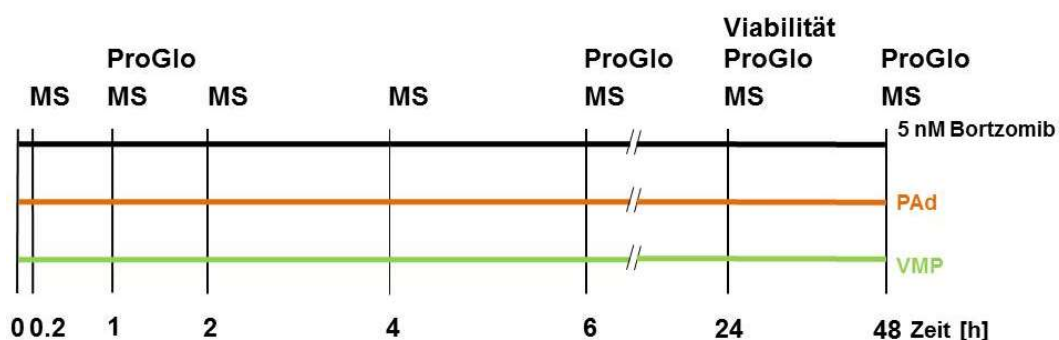


Abbildung 7: Versuchsaufbau zur Quantifizierung der intrazellulären Anreicherung von Bortezomib allein bzw. in Kombination mit 200 nM Doxorubicin und 300 nM Dexamethason (PAd) und 600 nM Melphalan und 3,1 µM Prednisolon (VMP), sowie Untersuchung der Wirksamkeit von Bortezomib in Bezug auf die Zellviabilität und Proteasomenaktivität in Zelllinien des Multiplen Myeloms innerhalb der Wirkstoffkombinationen. Die Zellen wurden über einen Zeitraum von 48 h mit 5 nM Bortezomib allein, sowie innerhalb der Kombinationstherapieregime PAd und VMP exponiert. Die intra- und extrazelluläre Bortezomibkonzentration wurde 10 min, 1 h, 2 h, 4 h, 6 h, 24 h, und 48 h nach Start der Inkubation mittels *ultra-performance liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry* (MS) bestimmt. Die Inhibition der Proteasomenuntereinheiten (ProGlo) wurde nach 1 h, 6 h, 24 h und 48 h bestimmt, wohingegen die Beeinflussung der Zellviabilität (Viabilität) nach 24 h ermittelt wurde.

2.8.2 Intrazelluläre Anreicherung von Bortezomib und deren Auswirkung auf die Zellviabilität und Proteasomenaktivität in MSC und Osteoblasten

In MSC und Osteoblasten (siehe **Abbildung 8**) wurde die Aktivität der C-, T-, und CT-like Proteasomenuntereinheiten nach 1 h, 6 h, 24 h und 48 h Inkubation mit 5 nM Bortezomib zeitgleich mit der Generierung der Zellpellets und Überstände zur intra- und extrazellulären Bortezomibquantifizierung durch UPLC/MS/MS bestimmt. Die Zellviabilität nach 48 h Exposition mit verschiedenen Bortezomibkonzentrationen wurde simultan mittels alamarBlue® Assay bestimmt.

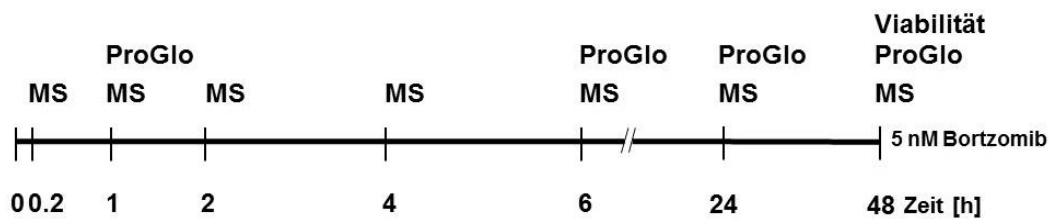


Abbildung 8: Versuchsaufbau zur Quantifizierung der intrazellulären Anreicherung von Bortezomib und deren Auswirkung auf die Zellviabilität und Proteasomenaktivität in mesenchymalen Stromazellen (*mesenchymal stromal cells*, MSC) und Osteoblasten. Die MSC bzw. Osteoblasten wurden über einen Zeitraum von 48 h mit 5 nM Bortezomib exponiert. Die intra- und extrazelluläre Bortezomibkonzentration wurde 10 min, 1 h, 2 h, 4 h, 6 h, 24 h, und 48 h nach Start der Inkubation mittels *ultra-performance liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry* (MS) bestimmt. Die Inhibition der Proteasomenuntereinheiten (ProGlo) wurde nach 1 h, 6 h, 24 h, und 48 h bestimmt, wohingegen die Beeinflussung der Zellviabilität (Viabilität) nach 48 h ermittelt wurde.

2.8.3 Intrazelluläre Anreicherung von Bortezomib in Kombination mit Bosentan und deren Auswirkung auf die Zellviabilität und Proteasomenaktivität

Zur Analyse des Zusammenhanges zwischen intrazellulärer Bortezomibanreicherung und Zellviabilität, sowie Aktivität der C-, T- und CT-like Proteasomenuntereinheiten nach Inkubation mit 5 nM Bortezomib allein oder in Kombination mit 100 µM Bosentan in Multiplen Myelomzelllinien wurde nach 1 h, 6 h, 24 h und 48 h simultan die ProteasomeGlo™ Assays, wie auch nach 48 h der alamarBlue® Assay durchgeführt und Proben zur Bortezomibquantifizierung generiert (siehe **Abbildung 9**)

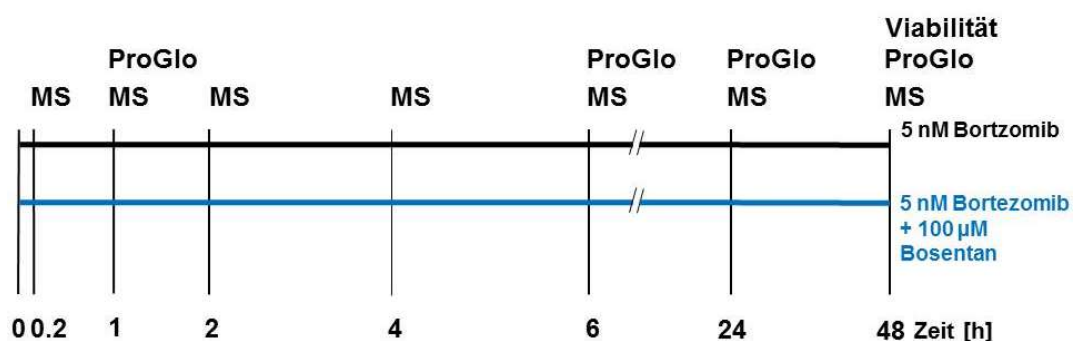


Abbildung 9: Versuchsaufbau zur Quantifizierung der intrazellulären Anreicherung von Bortezomib in Kombination mit Bosentan und deren Auswirkung auf die Zellviabilität und Proteasomenaktivität. Die Zellen wurden über einen Zeitraum von 48 h mit 5 nM Bortezomib allein oder in Kombination mit 100 µM Bosentan exponiert. Die intra- und extrazelluläre Bortezomibkonzentration wurde 10 min, 1 h, 2 h, 4 h, 6 h, 24 h, und 48 h nach Start der Inkubation *mittels ultra-performance liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry* (MS) bestimmt. Die Inhibition der Proteasomenuntereinheiten (ProGlo) wurde nach 1 h, 6 h, 24 h, und 48 h bestimmt, wohingegen die Beeinflussung der Zellviabilität (Viabilität) nach 48 h ermittelt wurde.

2.9 GEP

2.9.1 Rekrutierung gesunder Probanden und Patienten

Zur molekularen Charakterisierung normaler und maligner Plasmazellen wurden zwischen Januar 2002 und April 2016 n = 765 konsekutive Patienten mit symptomatischem, therapiepflichtigem Multiplem Myelom sowie n = 90 Patienten mit rezidiviertem/refraktärem Multiplem Myelom und n = 19 gesunde Spender als Vergleichspopulation eingeschlossen. Die Punktion erfolgte nach einer ärztlicher Aufklärung und schriftlicher Einwilligung der Probanden bzw. Patienten, gemäß der Richtlinien des Klinikums sowie der gesetzlichen Anforderungen nach der Deklaration von Helsinki. Die Ethikkommission der Medizinischen Fakultät Heidelberg hat den Untersuchungen zugestimmt (Ethikvotum #229/2003 und #S-152/2010). Die Rekrutierung der Patienten und Probanden, Isolation und *in vitro* Differenzierung der Proben, sowie die Durchführung und Auswertung der GEP wurde durch das Labor für Myelomforschung der Abteilung Innere Medizin V des Universitätsklinikums Heidelberg durchgeführt wie publiziert (Alaterre et al., 2017; Seckinger et al., 2017; Seckinger et al., 2015; Seckinger et al., 2009).

2.9.2 Probenaufbereitung

Maligne Plasmazellen und Knochenmark-Plasmazellen gesunder Spender wurden gemäß dem Protokoll im Labor für Myelomforschung aus Knochenmarkaspirat aufgereinigt. Periphere CD27⁺-Gedächtnis B-Zellen (memory B-cells, MBC) wurden mittels FACSria (Becton Dickinson) sortiert und ein Aliquot *in vitro* in polyklonale Plasmablasten differenziert (Tarte et al., 2002).

Die humanen Myelomzelllinien L363, SK-MM-2, LP-1, RPMI-8226, AMO-1, KMS-18, JIM-3, JJN3, KARPAS-620, KMS-12-BM, ANBL-6, KMS-11, MM1S, NCI-H929, KMS-12-PE, OPM-2, MOLP-8, MOLP-2, KMM-1, U266, und EJM wurden von der Deutschen Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, Braunschweig, der American Type Cell Culture (Wesel, Germany) bzw. den National Institutes of Biomedical Innovation, Health and Nutrition (Osaka, Japan) erworben und wie vorgeschrieben kultiviert. Die HG-Linien HG1, HG3, HG4, HG5, HG6, HG7, HG8, HG9, HG11, HG12, HG13, HG14, HG15, HG17 und HG19 wurden im Labor für Myelomforschung Heidelberg generiert, die XG-Linien XG1, XG2, XG3, XG4, XG5, XG6, XG7, XG10, XG11, XG12, XG13, XG14, XG16, XG19, XG20, XG21, XG22, XG23 und XG24 an der CHU Montpellier (Frankreich). Für proprietäre Zelllinien wurde die Zelllinienidentität mittels DNA-Fingerprinting untersucht sowie eine Kontamination mit Mykoplasmen bzw. eine EBV-Infektion mittels PCR-basierter Untersuchungsmethoden ausgeschlossen.

Die Isolation von MSC aus dem Knochenmark von Myelompatienten bzw. gesunder Spender, deren Charakterisierung und die nachfolgende osteogene Differenzierung erfolgten wie publiziert (Fuhler et al., 2010; Wagner et al., 2005).

2.9.3 RNA Extraktion

Die RNA der Proben wurde mit Hilfe des AllPrep DNA/RNA Mini Kits nach Anweisungen des Herstellers extrahiert. Die enthaltene RNA sowie DNA binden an das Sorbens der *binding column* und können im Anschluss mit RNase freiem Wasser eluiert werden. Zur Sicherstellung ausreichender Qualität (*RNA integrity number*) und Menge (Fluoreszenzintensität) der isolierten RNA, wurde die Probe mittels Agilent 2100 Bioanalyzer analysiert.

2.9.4 DNA Microarray

Die isolierte RNA (30-100 ng) wurde mit Hilfe des 3' *in vitro transcription* (IVT) Plus Reagenzien Kits des Affymetrix DNA Microarrays U133 2.0 plus nach Herstellerprotokoll in biotinylierte *complementary desoxyribonucleic acid* (cDNA) umgeschrieben. Im ersten Schritt wurde bei dieser Methode die RNA mittels T7-Oligo(dT) Primer zu einem cDNA Einzelstrang umgeschrieben, der im Anschluss zum Doppelstrang ergänzt wurde. Bei der anschließenden IVT wird dieses cDNA Template mit biotinmarkierten Ribonukleotidanaloga in cRNA umgeschrieben. Die so erhaltene biotinmarkierte cRNA wurde im Anschluss aufgereinigt, fragmentiert und an Oligonucleotide des DNA-Mikroarrays hybridisiert. Die relative Fluoreszenzintensität der einzelnen Gensequenzen wurde im Anschluss mit Hilfe des Affymetrix GeneChip® Scanner 3000 bestimmt.

2.10 Basale *messenger Ribonukleinsäure* (mRNA)- Expressionsanalyse von ET-1 und ET_A- und ET_B-Rezeptoren in Zelllinien des Multiplen Myeloms

Zur Bestimmung der basalen mRNA Menge von ET-1, ET_A- und ET_B-Rezeptoren in Myelomzelllinien wurden *real time reverse transcription-quantitative* PCR (qPCR) Analysen durchgeführt. Zur Probenvorbereitung wurden Pellets à 2 x 10⁶ unbehandelter Zellen erstellt und bis zur Analyse bei -80 °C gelagert.

2.10.1 RNA-Extraktion

Nach dem Auftauen der Zellen auf Eis wurden diese mit 500 µl PBS gewaschen. Zur RNA-Synthese wurde das GeneElute™ Mammalian Total RNA Miniprep Kit nach Anweisungen des Herstellers verwendet. Die Zellen wurden mit 500 µl einer Lyselösung (10 ml Mercaptoethanol + 1 ml GeneElute™ lysis solution) versetzt und unter mehrmaligen Resuspendieren lysiert. Das Lysat wurde in eine Filtrationssäule überführt und anschließend das Filtrat 1:2 mit 70 %-igem Ethanol zur DNA-Fällung versetzt und sorgfältig durchmischt. Das Gemisch wurde über eine GeneElute™ *binding column* gegeben, für 2 min bei 1000 g, RT zentrifugiert. Der Durchfluss wurde verworfen und anschließend mit 500 µl Waschlösung 1 versetzt. Die Säule wurde erneut für 15 s bei 1000 g, RT zentrifugiert, der Durchfluss verworfen und 500 µl GeneElute™ Waschlösung zugegeben. Nach erneuter Zentrifugation (2 min, 1000 g, RT) wurde der Durchfluss verworfen und die GeneElute™ *binding column* erneut aufgesetzt und wiederum zentrifugiert (2 min, 1000 g, RT). Nach Verwerfen des Durchflusses wurde die GeneElute™ *binding column* zum letzten Mal zentrifugiert (1 min, 1000 g, RT) und die RNA mit 50 µl RNase-freiem Wasser eluiert. Dieses Gemisch wurde für 1 min bei 1000 g zentrifugiert und die GeneElute™ *binding column* verworfen. Das Eluat wurde auf Eis gestellt und 2 µl der Lösung + 58 µl einer 10 mM TRIS Lösung photometrisch auf Gehalt ($\lambda_{\text{Absorption}} = 260 \text{ nm}$) und

Reinheit (Verhältnis zwischen 1,8-2,1 von $\lambda_{\text{Absorption}} = 260 \text{ nm} / \lambda_{\text{Absorption}} = 280 \text{ nm}$) überprüft. Zur Lagerung wurden die Proben bei -80°C aufbewahrt.

2.10.2 cDNA Synthese

Die isolierte RNA wurde mit Hilfe des *RevertAid H minus First Strand cDNA Synthese Kits* in cDNA umgeschrieben. Nach der photometrischen Gehaltsbestimmung wurde ein Volumen entsprechend $1 \mu\text{g}$ RNA mit $1 \mu\text{l}$ der *random hexamer primer* ad $12 \mu\text{l}$ in RNase-freiem Wasser verdünnt und bei 65°C für 5 min im Mastercycler inkubiert. Durch diesen Schritt wird die Sekundärstruktur der RNA zerstört. Die Proben wurden im Anschluss auf Eis mit $8 \mu\text{l}$ des RevertAid H Mastermix versetzt. Die cDNA Synthese erfolgte im Mastercycler mit folgendem Programm: 5 min bei 25°C , 60 min bei 42°C , 5 min bei 70°C mit anschließendem Herunterkühlen auf 4°C . Die cDNA wurde als Matrize (*template*) zur Amplifikation mittels qPCR genutzt. Die Proben wurden bei -20°C gelagert.

2.10.3 qPCR

Bei der qPCR werden unspezifische DNA-interkalierende Farbstoffe verwendet, in diesem Fall SYBR Green I, die sich in die doppelsträngigen PCR-Amplifikationsprodukte einlagern. Deren Menge und damit auch die Fluoreszenzintensität sind proportional zur Menge bzw. Expressionsstärke des *template*. Eine Quantifizierung ist nur in der exponentiellen Phase der qPCR möglich, da nur in dieser Phase ein direkter Zusammenhang zwischen Signalintensität und Menge des Ausgangsmaterials besteht. Die Fluoreszenz steigt hier bei jedem Amplifikationsschritt an. Zur Quantifizierung wird der Amplifikationszyklus bestimmt, bei dem die Fluoreszenz erstmals höher als die des Hintergrundes ist (*crossing point*, Cp). Je mehr *template* in der Probe vorhanden war, desto weniger Amplifikationszyklen sind nötig, um den Cp-Wert zu erreichen. Die Cp-Werte des Zielgens werden auf die Cp-Werte endogener konstitutiv exprimierter Genen der Zellen (Referenzgene) normiert, um auf unterschiedliche RNA-Extraktions- und cDNA-Synthese-Effizienz zu normieren. Die Stabilität der in der **Tabelle 20** aufgelisteten Referenzgene wurde in allen Zelllinien mittels des Programmes geNorm (Version 3.4) ermittelt (Vandesompele et al., 2002; Zisowsky et al., 2007).

Tabelle 20: Primersequenzen entsprechender Referenzgene zur Normierung der quantitativen Bestimmung der Genexpression von Endothelin-1, Endothelin A- und Endothelin B-Rezeptor mittels *quantitative polymerase chain reaction*

Referenzgen	Primersequenzen (forward 5'-3')	Primersequenzen (reverse 5'-3')
<i>60S human acidic ribosomal protein (HUPO)</i>	AGCTCTGGAGAACTGCTG	CAGCAGCTGGCACCTTATTG
<i>β-Actin (ACTB)</i>	TCCTTCCTGGGCATGGAGT	GCACTGTGTTGGCGTACAG
<i>β2mg</i>	CCAGCAGAGAATGGAAAGTC	CATGTCTCGATCCCACTTAAC
<i>β-Glucuronidase (GU)</i>	TTCACCAGGATCCACCTCTG	AGCACTCTCGTCGGTGACTG
<i>Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase (G6PDH)</i>	ATCGACCACTACCTGGGCAA	TCTGCATCACGTCCCGGA
<i>Hypoxanthin-Phosphoribosyl-Transferase 1 (hPRT)</i>	CTGGCGTCGTGATTAGTG	CACACAGAGGGCTACAATG

<i>Ribosomales Protein L13 (RPL13)</i>	GCTCATGAGGCTACGGAAAC	TATTGGGCTCAGACCAGGAG
<i>RNA Polymerase II (RP11)</i>	GCACCACGTCCAATGACAT	GTGCGGCTGCTTCATAA

Für die relative Quantifizierung der ET-1 (QuantiTect Primer Assay) und ET_A- und ET_B-Rezeptor-Expression wurden *β2mg*, *GU* und *RPL13* als Referenzgene gewählt (Ishida et al., 2012; Vandesompele et al., 2002). Bei jeder PCR wurde außerdem ein Kalibrator analysiert, der aus einem Gemisch der cDNA-Proben neun verschiedener Zelllinien des Multiplen Myeloms bestand, um Lauf-zu-Lauf Unterschiede auszugleichen. Die Expressionsstärke eines Gens wurde wie folgt mit Hilfe des Programmes RelQuant Version 1.01 berechnet:

$$normalized\ ratio = \frac{\frac{Zielgen_{Probe}}{Referenzgen_{Probe}}}{\frac{Zielgen_{Kalibrator}}{Referenzgen_{Kalibrator}}}$$

Am Ende der qPCR wurde zusätzlich eine Schmelzkurvenanalyse durchgeführt um sicherzustellen, dass ausschließlich das gewünschte Produkt und keine unspezifischen Nebenprodukte entstanden sind. Bei der für jedes Amplifikat spezifischen Schmelztemperatur wird hierbei die doppelsträngige DNA-Struktur unter Freisetzung des Fluoreszenzfarbstoffs zerstört.

Für die in **Tabelle 21** aufgelisteten Zielgene wurde die mittlere *normalized ratio* von n = 3 Proben pro Zelllinie berechnet.

Tabelle 21: Primersequenzen der Zielgene Endothelin-1 (ET-1), Endothelin A (ET_A)- und Endothelin B (ET_B)-Rezeptor zur quantitativen Bestimmung der Genexpression mittels *quantitative polymerase chain reaction* (qPCR)

Zielgen	Primersequenzen (forward 5'-3')	Primersequenzen (reverse 5'-3')
ET-1	*	*
ET _A -Rezeptor	TGTGGTCATTGATCTCCCTATC	CGCCAAAGTCATTGTGATCA
ET _B -Rezeptor	ATCGTCATTGACATCCCTATCA	GCTTACACATCTCAGCTCCAAA

* Unbekannte Primersequenz. Es wurde das *QuantiTectPrimer Assay Kit EDN1* der Firma Qiagen verwendet

2.11 Bestimmung der ET_B-Rezeptor-Expression mittels Western Blot

Die tatsächlich exprimierte Proteinmenge des ET_B-Rezeptors wurde mittels Western Blot ermittelt. Ein zuvor generiertes Pellet von 2 x 10⁶ wurde mit 300 µl NaCl-MES-Puffer (siehe **Tabelle 22**) mit Proteasehemmern (Pefabloc, Leupeptin, Pepstain und Aprotinin) versetzt und resuspendiert. Die Probe wurde für 20 min auf Eis inkubiert und 5 min bei 1600 x g und 4 °C zentrifugiert. Der Überstand wurde in ein neues Reaktionsgefäß zur Bestimmung der Proteinkonzentration mittels *Pierce™ BCA Protein Assay Kit* überführt.

Tabelle 22: Zusammensetzung des Proteasenmix in NaCl-2-(N-Morpholino)ethansulfonsäure (MES) Puffer

Reagenz	Menge
NaCl-MES-Puffer	10 ml
Pefabloc	250 µl
Leupeptin	50 µl
Pepstatin	10 µl
Aprotenin	10 µl

2.11.1 Proteinbestimmung

Die Proteinbestimmung erfolgte durch das auf der Biuretreaktion basierenden *Pierce™ BCA Protein Assay Kit* (Gornall et al., 1949). Dabei kommt es zur Reduktion von zweiwertigen Kupferionen durch die in der Probe enthaltenen Peptidbindungen, die durch die im Reaktionsmix enthaltene BCA unter Bildung eines lilafarbenen Komplexes kolorimetrisch detektiert werden können. Zur Kalibrierung wird mit BSA eine Verdünnungsreihe hergestellt (0; 0,025; 0,124; 0,25; 0,5; 0,75; 1; 1,5; 2 µg/µl) und durch lineare Regression eine Eichkurve erstellt. Es wurden 8 µl Standard, reinem NaCl-MES-Puffer (Leerwert) bzw. Probe/Well in eine 96-Well-Platte pipettiert und mit 64 µl der im Kit enthaltenen Arbeitslösung versetzt. Die Platte wurde zunächst für 30 s unter Ausschluss von Licht auf dem Thermomixer® geschüttelt. Im Anschluss wurde sie für 30 min bei 37 °C im Dunkeln inkubiert. Die Messung der Absorption erfolgte bei $\lambda = 555$ nm mittels Multiskan Photometer. Es wurden jeweils Duplikate der Proben, des Standards und der Leerwert-Kontrolle bestimmt.

2.11.2 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Die Auftrennung des Proteingemischs anhand des Molekulargewichts durch ein elektrisches Feld erfolgte durch SDS-Polyacrylamid Gelelektrophorese (SDS-PAGE) (Laemmli, 1970). Zur Vorbereitung wurden ein 10 %-iges APS Trenngel (**Tabelle 23**) hergestellt und mit einem Sammelgel (**Tabelle 24**) überschichtet. Zur Herstellung des Trenngels wurde das Gel bis ca. 2 cm unter dem Rand des Gelgießstandes gefüllt und mit 99 %-igem Isopropanol überschichtet. Nach 20 min Polymerisation wurde das Isopropanol entfernt und das Gel zwei Mal mit *Aqua purificata* gewaschen. Der Ansatz mit dem überschichteten Sammelgel wurde für 30 min unter Einsatz eines Kammes für 10 Beladungstaschen auspolymerisiert.

Tabelle 23: Zusammensetzung des 10 %-igen Ammoniumpersulfat (APS) Trenngels

Reagenz	Menge
<i>Aqua purificata</i>	2,04 ml
Acrylamid	1,66 ml
<i>Lower buffer</i> (pH = 8,8)	1,27 ml
APS	26 µl
TEMED	1,7 µl

Tabelle 24: Zusammensetzung des Sammelgels

Reagenz	Menge
<i>Aqua purificata</i>	915 ml
Acrylamid	200 µl
<i>Upper buffer</i> (pH = 6,8)	375 µl
APS	7,5 µl
TEMED	1,5 µl

Das Probevolumen wurde entsprechend der Gesamtproteinmenge von 20 µg Protein mit SDS Probenpuffer auf ein Volumen von 20 µl aufgefüllt und die Proben bei 99 °C für 5 min im

Thermomixer denaturiert. Das Gel wurde in die Gelkammer eingespannt und zusammen mit der Elektrodenkammer mit 1 x Laufpuffer aufgefüllt. Zur Größenbestimmung wurden 8 µl eines Größenmarkers in eine Tasche gegeben und die restlichen Gelkammern mit 20 µl der Proben bestückt. Es wurde anfänglich eine Spannung von 110 V für 20 min angelegt und sobald die Proben im Gel aus den Taschen gelaufen waren, wurde die Spannung auf 150 V erhöht. Nach ca. 120 min war der Lauf beendet.

2.11.3 Blotten der Gele

Durch das sogenannte Nassblott-Verfahren wurden die Proteine vom Gel auf eine Trägermembran (Optitran BA-S 85) durch ein an die Nassblottkammer angelegtes elektrisches Feld geblottet. Die Kammer wurde mit 1 x Transferpuffer gefüllt und der Transfer bei 65 V für 60 min, unter Wippen im Kühlraum vollzogen. Anschließend wurde die Membran mit 1 x Waschpuffer + 3 % Slim-Fast® (m/V) unter ständiger Wipp-Bewegung für 45 min bei RT geblockt. Im Anschluss wurde die Membran für 5 x 7 min mit 1 x Waschpuffer gewaschen. Die Membran wurde geteilt, um mit den entsprechenden Antikörpern gegen das Referenzprotein und dem zu bestimmenden ET_B-Rezeptor getrennt zu inkubieren. In diesem Fall wurde eine Membranhälfte über Nacht mit einer 1:1000 Verdünnung des Erstantikörpers gegen den ET_B-Rezeptor (50 kDa) unter Wippen inkubiert. Wohingegen die zweite Membranhälfte mit dem Erstantikörper gegen β-Actin (42 kDa) in einer Verdünnung von 1:20000 für 30 min bei RT auf einer Wippe inkubiert wurde. Beide Membranstücke wurden dann für 4 x 7 min in Waschpuffer gewaschen. Anschließend wurde der 1:2000 in Blockpuffer verdünnte, korrespondierende Zweitantikörper mit den Membranen inkubiert (50 min, RT, unter Wippen) und es folgte ein erneuter Waschschrift (4 x 7 min mit Waschpuffer).

2.11.4 Entwicklung der Blots

Die getrocknete Membran wurde in der frisch angesetzten Western-Blot-Entwicklerlösung (*Pierce ECL Western Blotting Substrate*) unter Ausschluss von Licht, unter Wippen für 1 min inkubiert. Die Intensität der Chemilumineszenz wurde im Anschluss mittels FluoroChem detektiert. Die semiquantitative Analyse der erhaltenen Banden erfolgte mittels der Software Image J Version 1.43.

2.12 ET-1 Quantifizierung in Zellkulturüberständen der Myelomzelllinien mittels *enzyme-linked immunosorbent assay* (ELISA)

Die Quantifizierung von ET-1 wurde nach Anweisungen des Herstellers mittels Quantikine® ELISA ET-1 Immunoassay nach dem allgemeinen Prinzip eines *sandwich*-ELISA durchgeführt. Hierzu wurden 1 x 10⁶ bzw. 2 x 10⁶ Zellen in 3 ml bzw. 1,5 ml korrespondierendem Zellmedium kultiviert. Nach 10 min, 1 h, 6 h und 24 h wurden 1,5 ml Zellsuspension in ein *low-binding* Reaktionsgefäß auf Eis überführt und mit 1 µM Aprotinin pro Probe versetzt. Der Zusatz des Proteasehemmers soll einen Abbau des ET-1 durch z.B. im FCS enthaltene Proteasen verhindern. Anschließend wurde die Probe für 5 min, 2600 rpm bei 4 °C zentrifugiert und 1 ml des Überstandes bei -20 °C bis zur Durchführung des ELISAs gelagert. Zur Kalibrierung bzw. späteren Quantifizierung wurde eine Verdünnungsreihe aus 250 pg/µl humanem ET-1 in *Aqua purificata* hergestellt. Diese umfasste folgende Verdünnungen in *calibrator diluent*: 15,7; 31,3; 62,6; 126; 251; 502 und 1003 fM. Auf einer mit einem monoklonalen spezifisch gegen ET-1 gerichteten immobilisierten Antikörper beschichteten 96-Well-Platte wurden 150 µl

assay diluent RD1-105 in jedem Well vorgelegt. Je 75 µl reiner *calibrator diluent* (Nullkontrolle) und die Kalibrierlösungen wurden als Dupletts in den ersten beiden Spalten der Platten aufgetragen. Für jede Zelllinie und entsprechenden Entnahmezeitpunkt wurden Vierfachwerte der 75 µl des Mediumüberstandes, sowie auch frischem Medium zur Kontrolle pipettiert. Die 96-Well-Platten wurden anschließend mit einem Adhäsionsstreifen bedeckt und für 1 h bei RT unter kontinuierlichem Schütteln (500 rpm) inkubiert. Die Überstände der Wells wurden nach der Inkubationszeit abgenommen und viermal mit 400 µl/Well Waschpufferlösung gewaschen. Nach vollständigem Entfernen des wässrigen Überstandes wurden 200 µl des ET-1 Konjugats pro Well zugegeben. Die Platten wurden erneut mit einem Adhäsionsstreifen verschlossen und weitere 3 h bei RT unter Schütteln (500 rpm) inkubiert. Im Anschluss wurde vierfach mit 400 µl Waschpuffer/Well gewaschen und nach dem letzten Schritt der wässrige Überstand restlos entfernt. Jedes Well wurde mit 200 µl Substratlösung versetzt und für 30 min bei RT unter Ausschluss von Licht inkubiert. Im letzten Schritt vor der photometrischen Bestimmung (450 nm/550 nm) wurde 50 µl einer *stop solution* in jedes Well gegeben. Dabei tritt ein Farbumschlag auf von blau zu gelb auf.

Die gemessene Absorption der einzelnen Endothelinverdünnungen bei 450 nm wurde von dem bei 555 nm ermittelten Wert subtrahiert und man erhält eine sogenannte „korrigierte optische Dichte“. Von der korrigierten optischen Dichte wird der Wert der korrigierten optischen Dichte der Nullkontrolle subtrahiert und mittels linearer Regression eine Kalibriergerade erstellt.

2.13 Zytotoxizitätsbestimmung von Bosentan in Zelllinien des Multiplen Myeloms

Zur Durchführung des Assays wurden die Zellen auf 6×10^5 Zellen/ml in HBSS resuspendiert. Es wurden 100 µl der Zellsuspension pro Well in eine 96-Well-Platte ausgesät. Reines HBSS wurde als Leerwertkontrolle verwendet. Die Zellen wurden 1:2 (V/V) mit 100 µl HBSS ohne Wirkstoff (Negativkontrolle), 1 % Triton® X-100 (Positivkontrolle) bzw. HBSS mit 50 oder 100 µM Bosentan für 1 h bei 37 °C exponiert. Nach der Inkubation wurde die Platte bei 1600 rpm, 5 min, RT zentrifugiert und 100 µl des Überstands aus jedem Well in eine neue 96-Well-Platte überführt. 100 µl des im Zytotoxizitäts Kit enthaltenen Reaktionsmix wurden jedem Well zugesetzt und für 30 min bei RT unter Ausschluss von Licht inkubiert. Nur in viablen Zellen mit bestehendem Redoxvermögen kann die freigesetzte LDH den bei der Milchsäuregärung beteiligten Cofaktor Nicotinamidadenindinukleotid (NAD^+) reduzieren und damit das im Reaktionsmix enthaltene gelbe Tetrazoliumchlorid in das rote Formazansalz überführen (Decker and Lohmann-Matthes, 1988). Diese Farbreaktion kann mittels Photometer bei $\lambda_{\text{Absorption}} = 492 \text{ nm}$ photometrisch gemessen werden. Von den gemessenen Absorptionswerten der Proben wurde der Leerwert subtrahiert und auf die Negativkontrolle normalisiert.

2.14 Statistische Analyse

Statistische Analysen sowie die Berechnung der Konzentrations-Wirkungs-Kurven auf Grundlage des Vier-Parameter-logistischen-nicht-linearen-Regressionsmodells wurden mittels GraphPad Prism Version 7 erstellt. Für die Kurven von Konzentrations-Wirkungsbeziehungen wurden die Mittelwerte \pm SD graphisch aufgetragen und die IC_{50} -Werte berechnet. Die Tests zur statistischen Signifikanz werden in **Tabelle 25** beschrieben. P-Werte $< 0,05$ wurden als signifikant angenommen.

Tabelle 25: Übersicht der verwendeten statistischen Tests

Experiment	Statistischer Test
Vergleich der AUC _{1-24 h} der extra- und intrazellulären Bortezomibkonzentration in Myelomzelllinien, primären Myelomzellen, MSC und Osteoblasten von Normalspendern und Patienten mit Multiplem Myelom.	Kruskal-Wallis Test mit post hoc <i>Dunn's multiple comparison</i> Test
Vergleich der AUC _{1-48 h} der extra- und intrazellulären Bortezomibkonzentration in Myelomzelllinien (n = 9) nach Exposition mit 5 nM Bortezomib allein oder innerhalb der Kombinationstherapieregime PAd und VMP.	Kruskal-Wallis Test mit post hoc <i>Dunn's multiple comparison</i> Test
Einfluss von 24-stündiger Exposition mit 300 nM Dexamethason, 200 nM Doxorubicin, 3,1 µM Prednisolon und 600 nM Melphalan auf die Zellviabilität von Myelomzelllinien (n = 7).	Kruskal-Wallis Test mit post hoc <i>Dunn's multiple comparison</i> Test
Vergleich der IC ₅₀ nach 24-stündiger Exposition mit Bortezomib allein oder innerhalb der Kombinationstherapieregime PAd und VMP in Bezug auf die Zellviabilität von Myelomzelllinien (n = 7).	Kruskal-Wallis Test mit post hoc <i>Dunn's multiple comparison</i> Test
Vergleich der inhibitorischen Potenz (IC ₅₀) von Bortezomib allein oder innerhalb der Kombinationstherapieregime PAd und VMP an der CT-like Proteasomenuntereinheit Myelomzelllinien (n = 7).	Kruskal-Wallis Test mit post hoc <i>Dunn's multiple comparison</i> Test
Expositionszeit-abhängige Inhibition der katalytischen Proteasomenuntereinheiten in Multiplen Myelomzelllinien (n = 7) durch 5 nM Bortezomib allein oder innerhalb der Kombinationstherapieregime PAd und VMP.	Kruskal-Wallis Test mit post hoc <i>Dunn's multiple comparison</i> Test
Korrelationsanalyse der für den ET _B -Rezeptor codierenden mRNA Menge zur ermittelten Proteinmenge.	Nicht-parametrische Spearman Korrelation
Vergleich der AUC _{1-48 h} der extra- und intrazellulären Bortezomibkonzentration in Multiplen Myelomzelllinien (n = 4) nach Exposition mit 5 nM Bortezomib allein oder in Kombination mit 100 µM Bosentan.	Kruskal-Wallis Test mit post hoc <i>Dunn's multiple comparison</i> Test
Vergleich der IC ₅₀ nach 48 h Exposition mit Bortezomib allein oder in Kombination mit 100 µM Bosentan, 100 nM ET-1, 10 µM BQ123 oder BQ788 in Bezug auf die Zellviabilität von Myelomzelllinien (n = 7).	Kruskal-Wallis Test mit post hoc <i>Dunn's multiple comparison</i> Test
Vergleich der IC ₅₀ nach 5 Tagen Exposition mit Bortezomib allein oder in Kombination mit 100 µM Bosentan, 100 nM ET-1, 10 µM BQ123 100 µM Bosentan in Bezug auf die Zellviabilität von Myelomzelllinien (n = 9).	Nicht-parametrischer Wilcoxon-Mann-Whitney-Test
Zytotoxizitätsassay von 100 µM Bosentan im Vergleich zur Zytotoxizität von Triton® X-100 in Zelllinien des Multiplen Myeloms (n = 8).	Nicht-parametrischer Wilcoxon-Mann-Whitney-Test

Die statistische Auswertung der GEP erfolgte mit Hilfe der Programme R Version 3.3 und Bioconductor Version 2.2 (Gentleman et al., 2004). Die Vorverarbeitung (Hintergrundkorrektur, Normalisierung, Zusammenfassung der Probes zu einem Probeset) der gewonnenen Rohdaten erfolgte für die Heidelberger Kohorte mittels GC-RMA-Verfahren (*GC-corrected Robust Microarray Average*) (Wu et al., 2004) bzw. mas5 Algorithmus für die Daten der *total therapy 2/3* (TT2/TT3) Validierungskohorte. In diesem Schritt werden die Daten um die Hintergrundfluoreszenzen korrigiert und auf die Kontrollen normiert. Da während der Probenaufarbeitung zwei verschiedene *in vitro* Transkriptionskits verwendet wurden, wurde eine Batchkorrektur mittels ComBat vorgenommen (Johnson et al., 2007). Zur Bestimmung des Vorhandenseins („exprimiert“) bzw. der Abwesenheit („nicht exprimiert“) der Expression eines Gens, unabhängig von den Affymetrix-*mismatch*-Probensätzen, wurde der PANP- (*presence-absence calls with negative probesets*) Algorithmus angewandt (Warren et al., 2007). Bei Genen, die mehrfach durch verschiedene Probensätze auf dem Chip codiert sind, wurden die erhaltenen Daten nach Varianz und Signalintensität sortiert. Lediglich jene mit der maximalen Varianz bei gleichzeitig höchster Signalintensität wurden zur anschließenden Analyse verwendet. Die Expressionsdaten wurden in ArrayExpress unter folgenden Zugangsnummern hinterlegt: E-MTAB-4715, E-MTAB-4717, E-MTAB-5212, E-TABM-937, und E-TABM-1088. Der statistische Zusammenhang der Expressionshöhe der Proteasomenuntereinheiten und dem Verhältnis zwischen intra- und extrazellulärer Anreicherung, sowie der korrespondierenden inhibitorischen Potenz von Bortezomib wurde durch den Korrelationskoeffizient nach Pearson beschrieben.

Die Untersuchung des ereignisfreien und Gesamtüberlebens von Patienten mit symptomatischem Multiplem Myelom, welche im Rahmen der Erstlinientherapie mittels einer Hochdosis-Chemotherapie behandelt wurden, erfolgte mittels Cox-Regression (Fleming et al., 1984). Zur Analyse der prognostischen Bedeutung wurden Patienten mit einer hohen bzw. niedrigen Expression mittels *Maximally Selected Rank Statistics* aufgetrennt. Die Validierung der Überlebensdaten erfolgte auf der unabhängigen TT2/TT3 Kohorte (Barlogie et al., 2006; van Rhee et al., 2010). Die Kurven zur Ereigniszeitanalyse wurden mittels nicht-parametrischer Überlebenszeitschätzung durch Anwendung des Kaplan-Meier-Schätzers berechnet (Kaplan und Meier, 1958). Signifikanzniveaus wurden mittels G-rho Logrank Test ermittelt (Harrington und Fleming, 1982). P-Werte < 0,05 wurden als signifikant angenommen.

Die bioinformatischen bzw. statistischen Analysen der GEP, sowie der Ereigniszeitanalyse wurden im Labor für Myelomforschung der Abteilung Innere Medizin V des Universitätsklinikums Heidelberg durchgeführt.

3. Ergebnisse

3.1 Etablierung der Expansion, osteogenen Differenzierung und Charakterisierung der MSC

Zur Bestimmung der zellulären Pharmakokinetik und Pharmakodynamik von Bortezomib in MSC und Osteoblasten wurden die Kultivierungs- und Differenzierungsmethoden nach Literaturangaben etabliert und standardisiert (Protokoll nach Seckinger A., (Wagner et al., 2005)). Gemäß geltenden Leitlinien wurden die Charakteristika für MSC sowohl makroskopisch als auch mittels Durchflusszytometrie und photochemischer Färbung nachgewiesen (Dominici et al., 2006).

3.1.1 Etablierung der Expansion von MSC

Die aus der Negativfraktion gewonnenen MSC adhärten in kugelförmiger Morphologie mit hoher Teilungsrate nach 48 h an den Boden der Flasche. Nach 5-7 Tagen bildeten sich einzelne spindelförmige proliferierende Zellen aus. Bei einer Konfluenz bis zu 100 % (**Abbildung 10**) lagerten sich die Zellen parallel zu einem fischzugartigen Monolayer zusammen. Die Zellen stagnierten in ihrer Proliferationskapazität ab Passage 10-12. Die MSC konnten mit 0,25 %-igem Trypsin von den Zellkulturflaschen gelöst werden und nahmen dabei eine kugelförmige Morphologie an. Das durchschnittliche Zellvolumen betrug 4338 fl und der mittlere Zelldurchmesser 20,3 µm nach Trypsinierung. Die kultivierten Zellpopulationen wiesen morphologisch die für MSC charakteristischen Merkmale auf. MSC von Spendern und Patienten zeigten in allen Passagen der Kultivierung das von der Internationalen Gesellschaft für Zelltherapie geforderte plastikadhärente Wachstum.

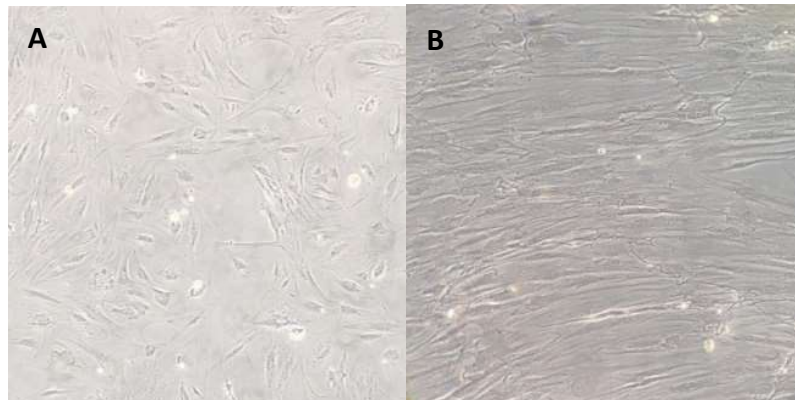


Abbildung 10: Lichtmikroskopische Aufnahme von mesenchymalen Stromazellen (*mesenchymal stromal cells*, MSC) (Vergrößerung: 20 x). (A) MSC 7 Tage nach Aussaat der Negativfraktion in einer Konfluenz von 40 % an der dichtesten Stelle. Spindelförmige und zum Teil noch kugelförmige Zellen mit hoher Teilungsrate sind zu sehen. (B) MSC 16 Tage nach Aussaat der Negativfraktion in einer Konfluenz von 100 %. Die spindelförmigen Zellen haben sich zu einem fischzugartigen Monolayer parallel zusammengelagert.

3.1.2 Etablierung der osteogenen Differenzierung von MSC

Zur Differenzierung von MSC wurden unterschiedliche Medien auf Basis von *Alpha-Minimal Essential Medium* und DMEM bei 100 % Konfluenz der MSC getestet. Zur vollständigen osteogenen Differenzierung kam es unter Kultivierung in DMEM-Medium mit Dexamethason, β -Glycerophosphat und L-Ascorbinsäure. Nach einer Woche Exposition mit Differenzierungsmedium waren erste morphologische Veränderungen unter dem Lichtmikroskop sichtbar (**Abbildung 11**). Osteoblasten zeigten ein größeres Zellvolumen und die spindelförmige Gestalt wurde bis hin zur Sternform erweitert. Die Osteoblasten bildeten teilweise Multilayer mit kopfsteinartigem Muster aus. Nach 10–14 Tagen zeigten sich auch makroskopisch weiße Ablagerungen am Boden der Zellkulturgefäße, welche auf die Ausbildung der extrazellulären Matrix zurückzuführen sind. Ein Nachweis der positiven Differenzierung mittels ARS wurde nach 10–14 Tagen erreicht. Durch die bis zu diesem Zeitpunkt eingesetzte Kalzifizierung der Zellen ließen sich diese nicht mehr durch Trypsin von den Zellkulturgefäßen lösen. Die Zellen wurden zur experimentellen Bestimmung der intrazellulären Bortezomibkonzentration deshalb mit einem Zellschaber gelöst. Nach Differenzierung war eine weitere Passagierung bzw. Expansion von Osteoblasten nicht möglich. Nach Ablösen der Zellen betrug das durchschnittliche Zellvolumen 3519 fl und der mittlere Zelldurchmesser 17,8 μm .

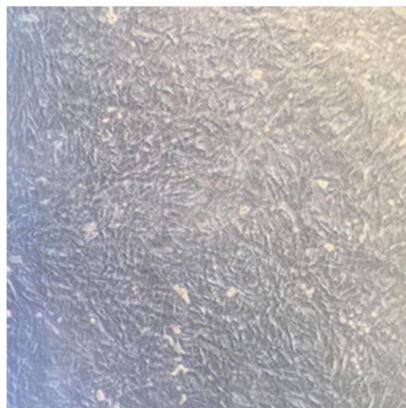


Abbildung 11: Lichtmikroskopische Aufnahme von Osteoblasten (Vergrößerung 20 x). Osteoblasten 18 Tage nach Zugabe des osteogenen Differenzierungsmediums. Zu erkennen ist das charakteristische kopfsteinartige Muster und kristalline Ausfällung durch die Bildung der kalzifizierten extrazellulären Matrix.

3.1.3 Test auf Verunreinigung mit Mykoplasmen

Im Zellkulturüberstand aller kultivierten MSC wurden keine Verunreinigungen mit Mykoplasmen mittels qPCR festgestellt (siehe exemplarisch **Abbildung 12**).

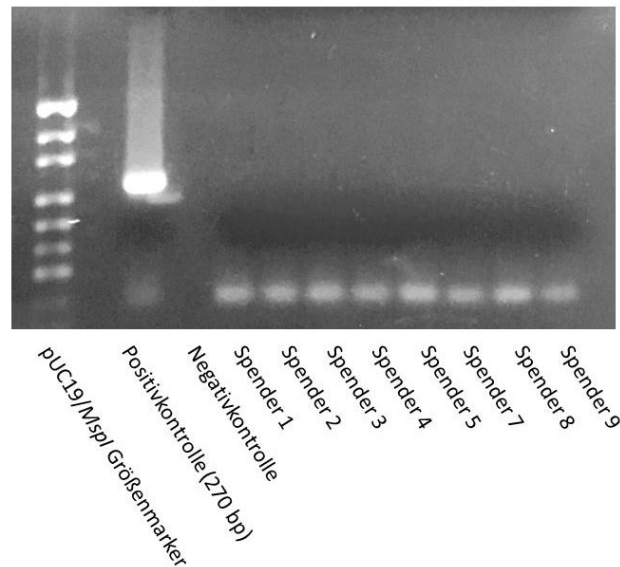


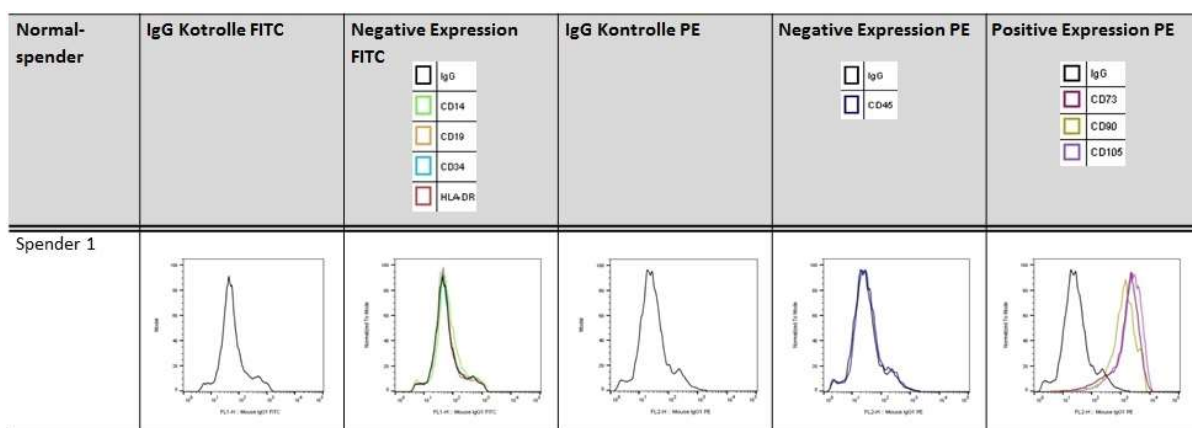
Abbildung 12: Test auf Verunreinigung mit Mykoplasmen. Exemplarisch wird die Bestimmung von Mykoplasmen im Zellkulturüberstand der *mesenchymal stromal cells* (MSC) von den Normalspendern Spender 1-5 und Spender 7-9 mittels Mykoplasmen *polymerase chain reaction* (PCR) Kit gezeigt. Im Vergleich zur Positivkontrolle sind in den Proben keine Verunreinigungen mit Mykoplasmen nach Auftrennung im Agarosegel zu sehen.

3.1.4 Durchflusszytometrische Charakterisierung der MSC

Die für die weiteren Experimente verwendeten MSC-Kulturen von Spendern und Patienten wurden durchflusszytometrisch auf deren charakteristische Merkmale hin überprüft. Zur Bestimmung der in der Literatur geforderten Minimalkriterien für MSC wurden die Zellen bezüglich des Expressionsmusters folgender Oberflächenantigene getestet:

- positive Oberflächenantigenexpression: CD73, CD90, CD105,
- fehlende Oberflächenantigenexpression: CD14, CD19, CD34, CD45 und HLA-DR.

Jede der getesteten Zellpopulation wies den geforderten Phänotyp auf (**Abbildung 13** und **14**). Zellen gesunder Spender unterschieden sich nicht in ihrem Expressionsmuster von den Zellen der Patienten mit therapiepflichtigem Multiplem Myelom. Die verwendete Isolationsmethode der MSC aus der Negativfraktion von Knochenmarkaspiraten und die anschließende Kultivierung führten zur stabilen Expression von Markern mesenchymaler Stromazellen.



Ergebnisse

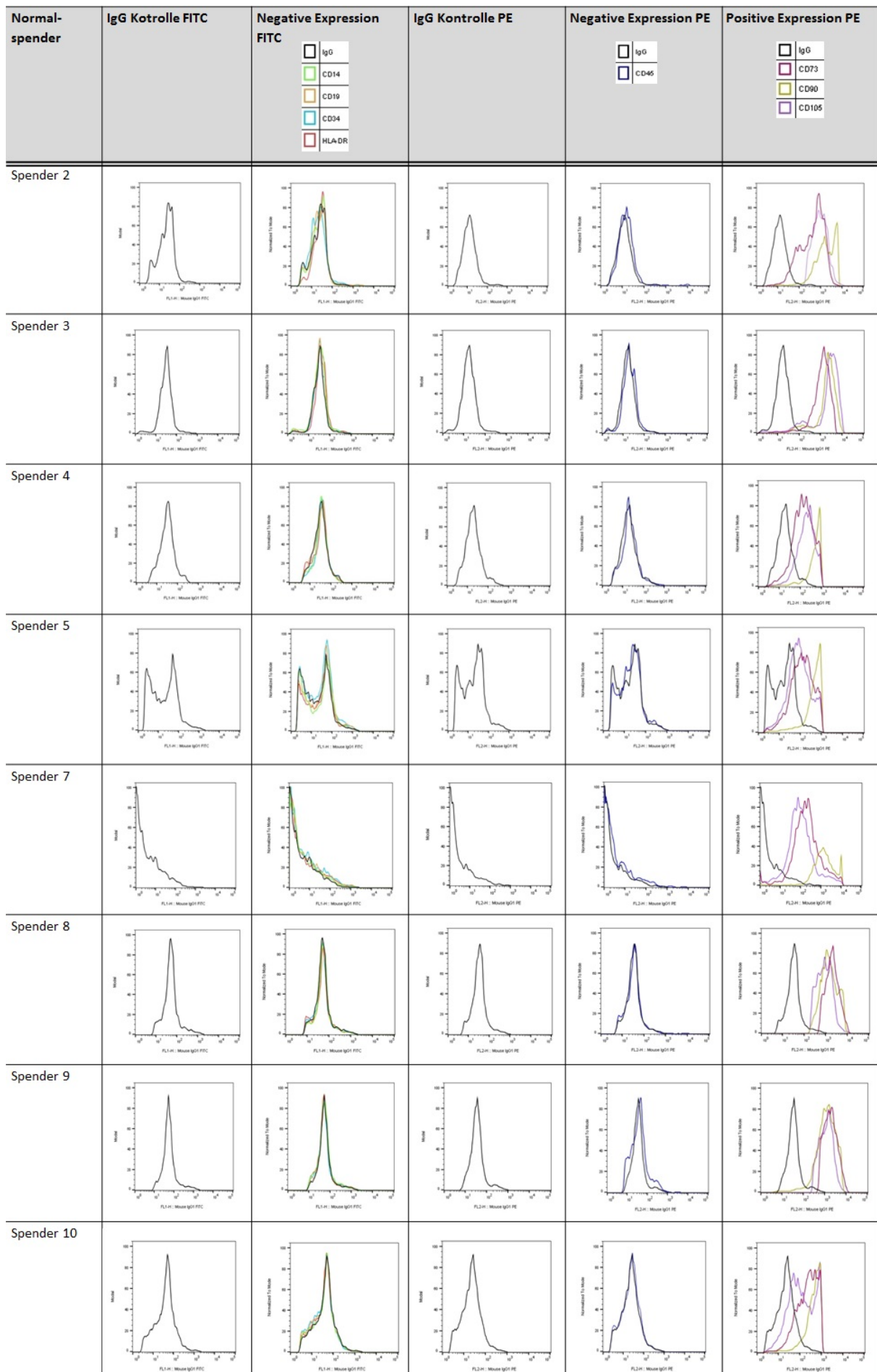
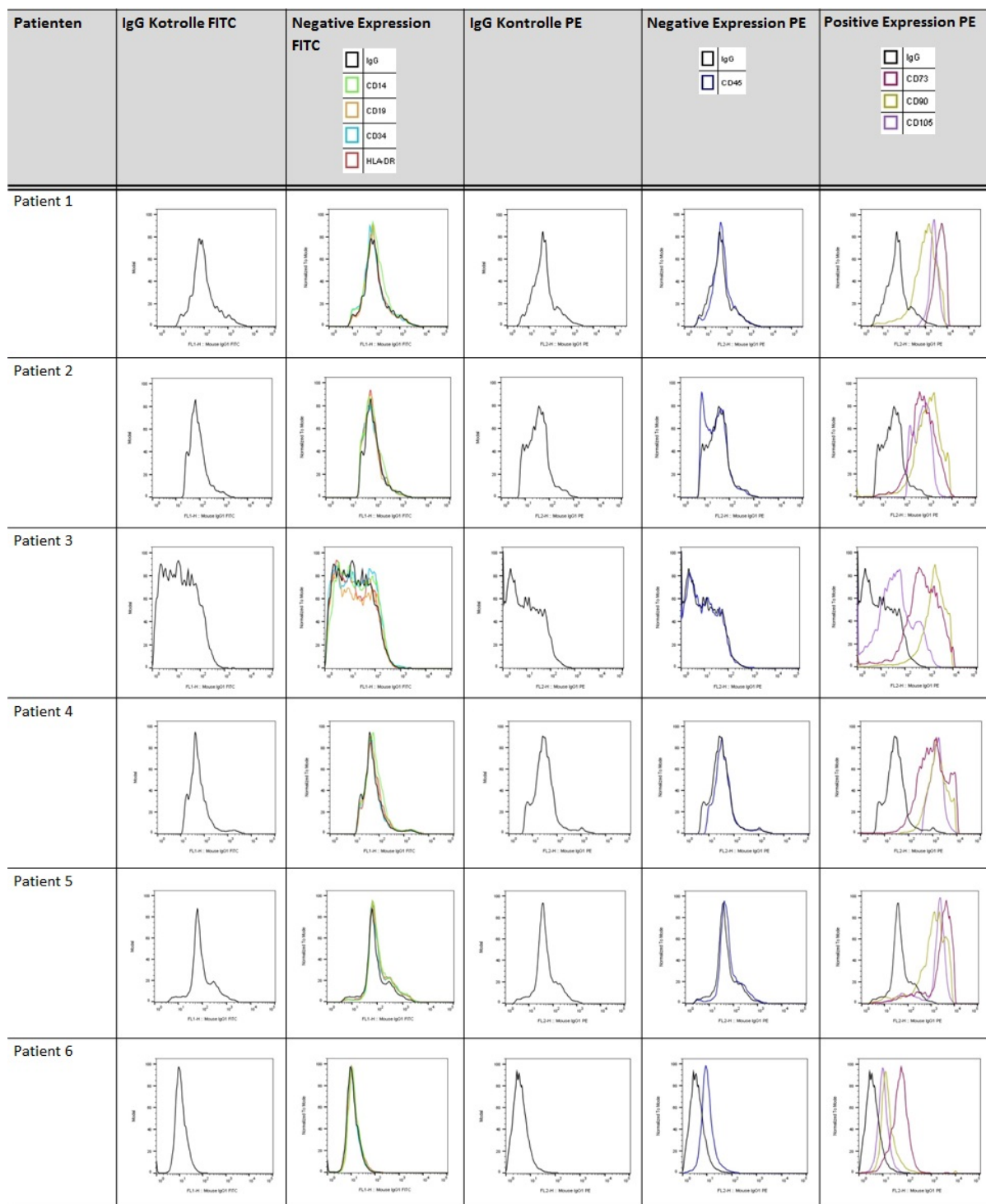


Abbildung 13: Durchflusszytometrische Charakterisierung der mesenchymalen Stromazellen (*mesenchymal stromal cells, MSC*) von gesunden Normal Spendern. Für die fehlende Expression der Oberflächenantigene *cluster of differentiation* (CD) 14, CD19, CD34, CD45 und *human leucocyte antigen DR-isotype* (HLA-DR) ergibt sich keine charakteristische Rechtsverschiebung der Probe im Vergleich zur *fluorescein-isothiocyanat* (FITC)- bzw. *phycoerythrin* (PE)-gekoppelten Immunglobulin G-(IgG) Kontrolle. Für die stark exprimierten Oberflächenantigene CD73, CD90 und CD105 zeigen die untersuchten Proben eine deutliche Rechtsverschiebung im Vergleich zu PE-markierten IgG-Kontrolle. Die getesteten Proben wiesen das geforderte Expressionsmuster auf.



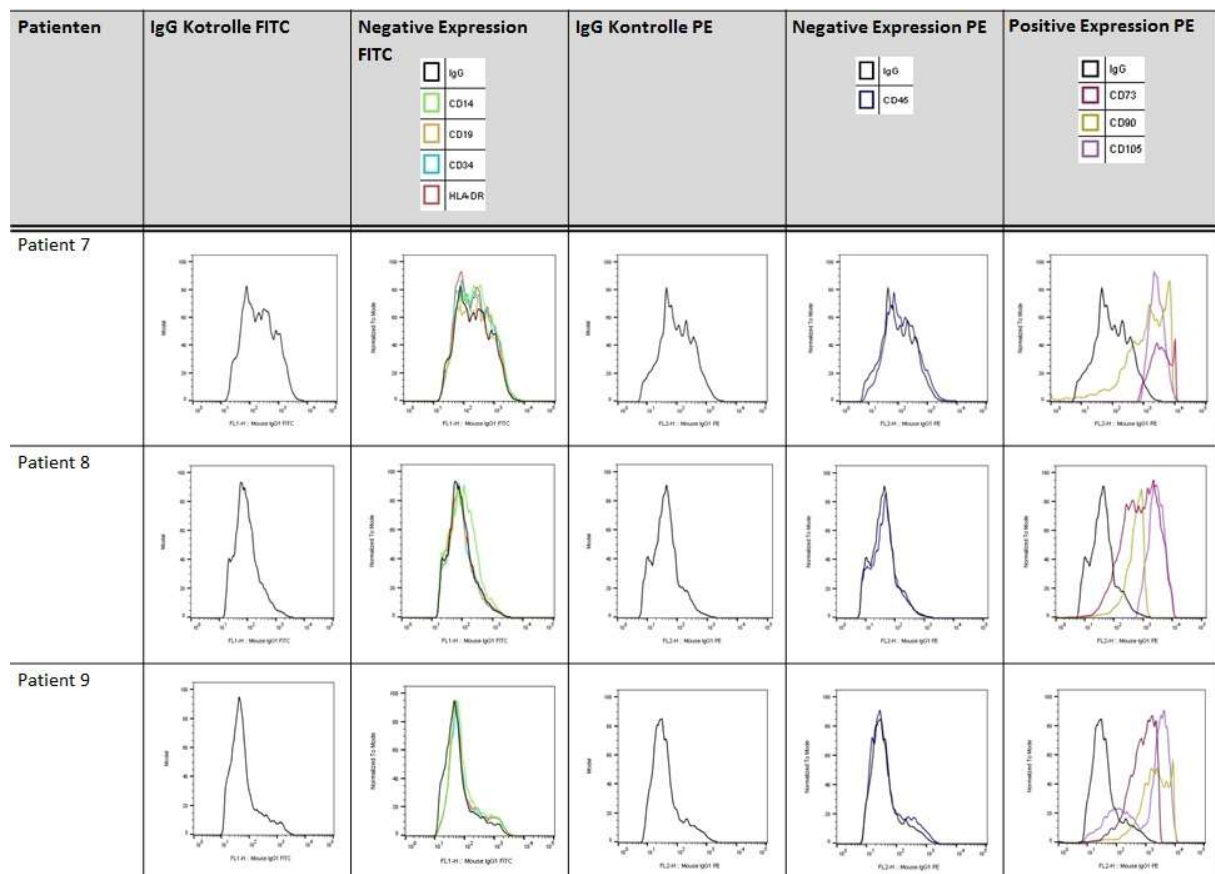



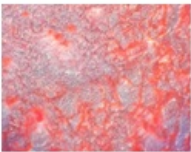
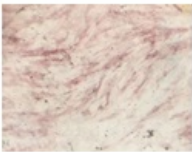

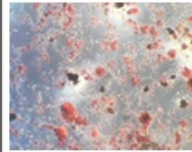

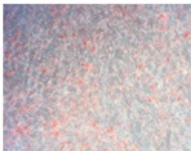
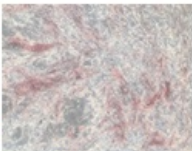
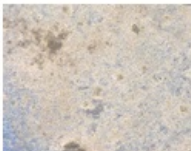
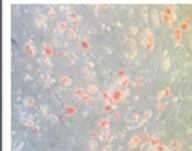

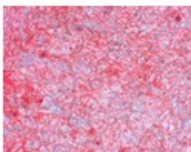


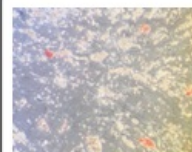

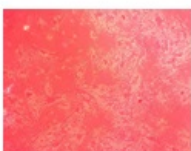

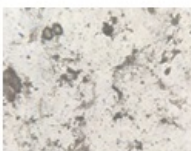
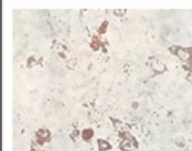

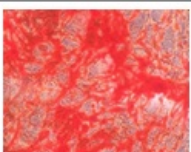
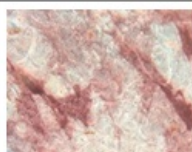


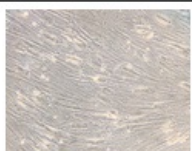


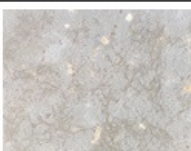


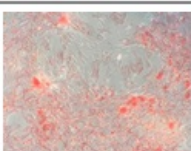




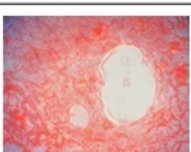
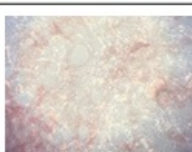
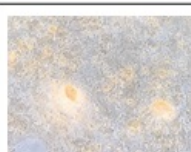
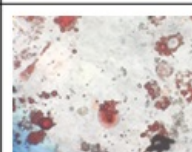
Abbildung 14: Durchflusszytometrische Charakterisierung der mesenchymalen Stromazellen (*mesenchymal stromal cells, MSC*) von Multiplen Myelom Patienten. Für die fehlende Expression der Oberflächenantigene *cluster of differentiation* (CD) 14, CD19, CD34, CD45 und *human leucocyte antigen DR-isotype* (HLA-DR) ergibt sich keine charakteristische Rechtsverschiebung der Probe im Vergleich zur *fluorescein-isothiocyanat* (FITC)- bzw. *phycoerythrin* (PE)-gekoppelten Immunglobulin G (IgG) Kontrolle. Für die stark exprimierten Oberflächenantigene CD73, CD90 und CD105 zeigen die untersuchten Proben eine deutliche Rechtsverschiebung im Vergleich zu PE-markierten IgG-Kontrolle. Die getesteten Proben wiesen das geforderte Expressionsmuster auf.

3.1.5 Nachweis des osteogenen und adipogenen Differenzierungspotentials der MSC

Eine weitere wichtige Eigenschaft von MSC ist deren multipotente Differenzierungsfähigkeit. Die Zellen wurden mit osteogenem oder adipogenem Medium exponiert, um nach 14 Tagen charakteristische Differenzierungsmarker durch histochemische Färbungen nachzuweisen. Das während der osteogenen Differenzierung angereicherte Kalziumphosphat konnte zum einen makroskopisch durch Ausfällung von Kristallen und Milchglas-artigen Ablagerungen auf dem Boden der Platte erfasst werden, zum anderen durch die ARS und von Kossa-Färbung. Die Komplexierung des Kalziums durch ARS bzw. Reaktion des Kalziumphosphats unter Ausfällung von Silber konnte in allen Spendern mit unterschiedlicher Ausprägung gezeigt werden. Weiterhin mit reinem Expansionsmedium behandelte Zellen zeigten keine Färbung mit ARS oder von Kossa-Reagenzien. Die gesteigerte Aktivität der ALP wurde mittels histochemischer Färbung für alle differenzierten MSC von Probanden und Spendern nachgewiesen, wohingegen diese bei unbehandelten MSC nicht nachweisbar war. Das adipogene Differenzierungsvermögen wurde durch Anfärben der entstehenden Lipidvakuolen mittels *Oil Red O* für alle getesteten MSC gezeigt. MSC gesunder

Ergebnisse

Probanden und Patienten mit therapiepflichtigem Multiplen Myelom wiesen alle ein osteogenes und adipogenes Differenzierungspotential auf, die Ausprägung war allerdings interindividuell verschieden (**Abbildung 15** und **16**).

Normal-spender	Kontrolle	Osteogenes Differenzierungspotential			Adipogenes Differenzierungs-potential
		ARS	Nachweis der ALP	Von Kossa Färbung	
Spender 1					
Spender 2					
Spender 3					
Spender 4					
Spender 5					
Spender 6					
Spender 7					
Spender 8					

Ergebnisse


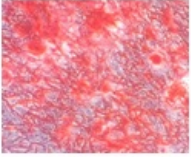


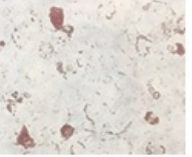
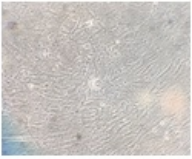
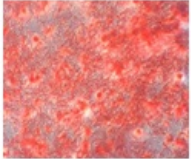
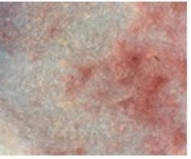
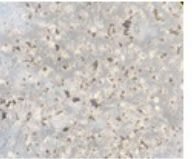
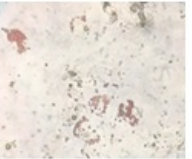
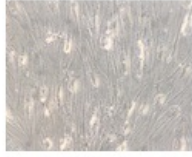
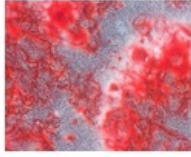
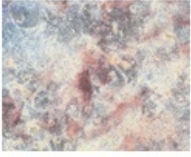

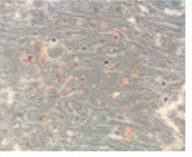


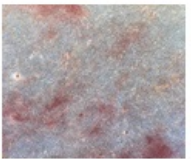
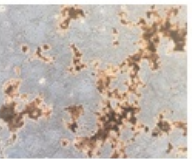
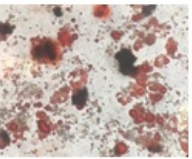
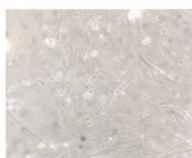


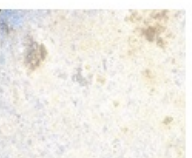
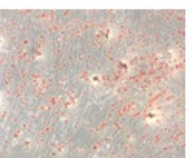
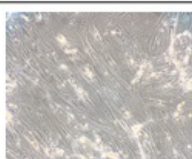
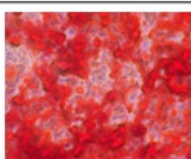
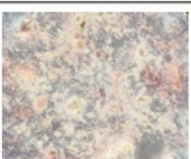

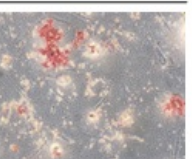
Normal-spender	Kontrolle	Osteogenes Differenzierungspotential			Adipogenes Differenzierungs-potential
		ARS	Nachweis der ALP	Von Kossa Färbung	
Spende 9					
Spende 10					

Abbildung 15: Histochemische Qualitätskontrolle durch Nachweis der alkalischen Phosphatase (ALP), alizarin red staining (ARS), von Kossa- und Oil Red O-Färbung in differenzierten Osteoblasten und Adipozyten aus Normalspendern. Zur Kontrolle dienten mesenchymale Stromazellen (*mesenchymal stromal cells, MSC*) in Expansionsmedium. Alle untersuchten MSC von Normalspendern zeigten eine deutliche Rotfärbung durch ARS und beim Nachweis der ALP. Ebenso war ein metallischer dunkler Silberniederschlag nach der von Kossa-Färbung sichtbar. Das adipogene Differenzierungspotential wurde durch die Rotfärbung der Lipidvakuolen für alle MSC Proben von Normalspendern bestätigt.

Patienten	Kontrolle	Osteogenes Differenzierungspotential			Adipogenes Differenzierungs-potential
		ARS	Nachweis der ALP	Von Kossa Färbung	
Patient 1					
Patient 2					
Patient 3					
Patient 4					

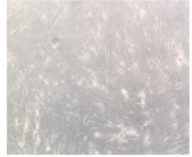
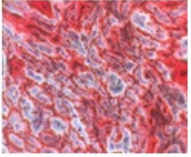
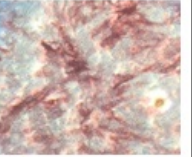

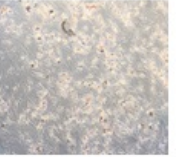



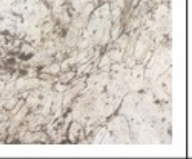




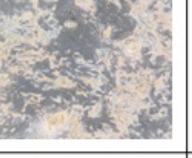
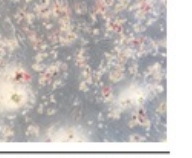
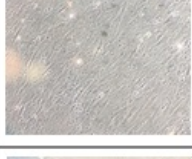

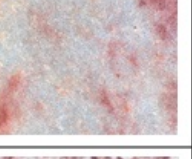

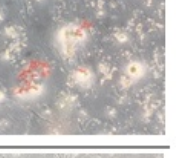


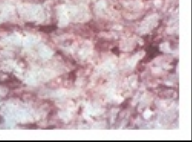


Patienten	Kontrolle	Osteogenes Differenzierungspotential			Adipogenes Differenzierungs-potential
		ARS	Nachweis der ALP	Von Kossa Färbung	Oil Red O Färbung
Patient 5					
Patient 6					
Patient 7					
Patient 8					
Patient 9					

Abbildung 16: Histochemische Qualitätskontrolle durch Nachweis der alkalischen Phosphatase (ALP), *alizarin red staining* (ARS), von Kossa- und *Oil Red O*-Färbung in differenzierten Osteoblasten und Adipozyten aus Patienten mit Multiplem Myelom. Zur Kontrolle dienten mesenchymale Stromazellen (*mesenchymal stromal cells, MSC*) in Expansionsmedium. Alle untersuchten MSC von Patienten zeigten eine deutliche Rotfärbung durch ARS und beim Nachweis der ALP. Ebenso war ein metallischer dunkler Silberniederschlag nach der von Kossa-Färbung sichtbar. Das adipogene Differenzierungspotential wurde durch die Rotfärbung der Lipidvakuolen für alle MSC Proben von Patienten bestätigt.

3.2 Adaption der UPLC/MS/MS Methode zur Quantifizierung von Bortezomib in Proben aus primären Zellen, MSC und Osteoblasten

Die intra- und extrazelluläre Konzentration von Bortezomib in den Proben wurde mittels der bereits publizierten UPLC/MS/MS-Methode quantifiziert (Clemens et al., 2014). Diese wurde nach den geltenden FDA und EMA Guidelines für Bioanalytische Methoden validiert und ein LLOQ von 0,5 pg/1x10⁶ Zellen bzw. 0,5 pg/100 µl Zellkulturmedium erreicht (entsprechen 13 pM) etabliert (FDA, 2018; EMA, 2011). Die Bestimmung der Aufnahmekinetik von Bortezomib in primäre Zellen des Multiplen Myeloms, MSC und Osteoblasten erforderte die Adaption der Methode an Zellzahlen < 1 x 10⁶ Zellen pro Pellet, andere Zellkulturmedien, sowie veränderte Matrixeffekte.

3.2.1 Adaption der UPLC/MS/MS Methode zur Quantifizierung von Bortezomib in Proben aus MSC und Osteoblasten

Um eine sensitive, zuverlässige Messung auch bei niedrigen Zellzahlen ($< 1 \times 10^6$) experimentell zu gewährleisten, wurde zunächst ein Vorversuch unter Einsatz einer Zellzahl von 1×10^4 Karpas-620 Zellen pro Pellet durchgeführt. Bortezomib war trotz der eingesetzten niedrigen Zellzahlen zu allen getesteten Zeitpunkten deutlich über dem LLOQ quantifizierbar (**Abbildung 17**).

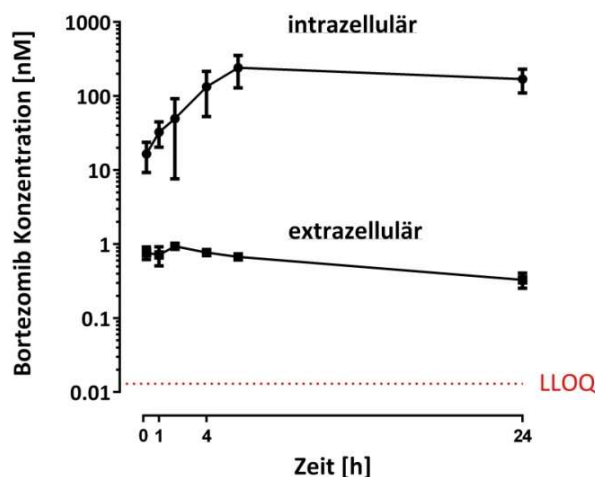


Abbildung 17: Expositionszeit-abhängige intra- und extrazelluläre Bortezomibkonzentration in Pellets von 1×10^4 Zellen der Myelomzelllinie Karpas-620. Trotz geringer Zellzahl (1×10^4 Zellen/Pellet) waren über den gesamten Expositionszeitraum (10 min, 1 h, 2 h, 4 h, 6 h und 24 h) Bortezomibkonzentrationen weit über dem *lower limit of quantification* (LLOQ = 13 pM) quantifizierbar. Die Daten zeigen den Mittelwert \pm Standardabweichung für $n = 3$ Messwerte.

Aufgrund der limitierten Zellzahl konnten auch die Kalibrier- und QC-Proben nicht mit MSC- oder Osteoblasten-Leerproben angesetzt werden. Alternativ mussten daher Zellen mit vergleichbaren Matrixeffekten mit den Kalibrier- und Standardlösungen zur Quantifizierung von Bortezomib in MSC und Osteoblasten versetzt werden. Hierzu wurden 1×10^6 Zellen der murinen Leukämiezelllinie P388 pelletiert, mit den entsprechenden Kalibrier- und QC-Lösungen gespiked und simultan 1 bzw. 2 Leerpellets der im Versuch verwendeten MSC bzw. Osteoblasten ebenfalls mit der QC B-Lösung versetzt. Die ermittelte Bortezomibkonzentration des QC B in P388-Zellen wurde im Anschluss mit denen der Leerproben verglichen. Unabhängig von der Zellart streuten die ermittelten Konzentrationen für die zugesetzte QC B-Lösung in den Pellets stark um den Mittelwert. Die Mittelwerte der mit der QC B-Lösung versetzten P388-, MSC- und Osteoblasten-Zellen unterschieden sich aber nicht. Die Verwendung von P388 Zellpellets zeigte vergleichbare Extraktionsraten von Bortezomib bzw. auch dem IS, was auf vergleichbare Matrices der Zellproben schließen lässt. Daher wurden Pellets dieser Zelllinie im Folgenden für alle Kalibrier- und QC-Proben verwendet.

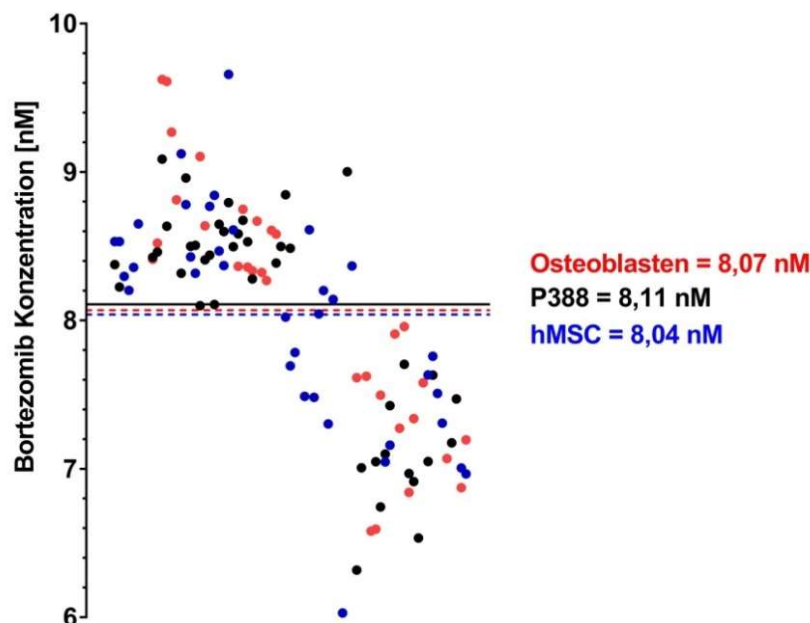


Abbildung 18: Vergleich der Extraktionsraten von Bortezomib aus den mit der *quality control B* (QC B)-Lösung versetzten Osteoblasten, P388 und mesenchymalen Stromazellen (*mesenchymal stromal cells*, MSC). Aufgrund der limitierten Zellzahl wurden die Kalibrier- und QC-Lösungen zur Quantifizierung der intra- und extrazellulären Bortezomibkonzentration in MSC oder Osteoblasten in Zellpellets der murinen Leukämiezelllinie P388 gespiked. Zum Vergleich der Extraktionsrate und damit auch der unterschiedlichen Probenmatrices wurden, simultan in jedem Batch, auch zwei Pellets der in den Uptake-Versuchen verwendeten MSC oder Osteoblasten mit der QC B-Lösung versetzt. Dargestellt sind die Schwankungen der einzelnen mit der QC B-Lösung versetzten Zelltypen um den Mittelwert der quantifizierten Bortezomibkonzentration [nM] für alle gemessenen Batches. Osteoblasten (8,07 nM), P388 (8,11 nM) und MSC (8,04 nM) unterscheiden sich kaum im Mittelwert und dem Streuungsverhalten. Es konnte demnach gezeigt werden, dass P388-Zellpellets vergleichbare Extraktionsraten von Bortezomib aufweisen, was auf vergleichbare Matrices der Zellproben schließen lässt.

3.2.2 Validierung der Quantifizierung von Bortezomib mittels UPLC/MS/MS unter Anwendung der Festphasenextraktionsmethode

Zur Minimierung von Matrixeffekten, die bei der Quantifizierung von Bortezomib im Laufe der Versuchsserien zunehmend auftraten, wurde die bereits validierte UPLC/MS/MS-Methode hinsichtlich des Extraktionsverfahrens optimiert. Die Extraktion von Bortezomib aus Zellkulturüberständen erfolgte anschließend nicht mehr wie bisher mittels LLE, sondern durch SPE. Zunächst wurde geprüft, ob es durch das veränderte Extraktionsverfahren und insbesondere durch das veränderte Elutionsmittel zu Verlusten von Bortezomib während der Aufarbeitung kommt. Hierzu wurden sowohl die zur Konditionierung der Kartusche und Nachspülen verwendete 0,1 M HCl, als auch der 5 %-ige Methanol aufgefangen, davon 10 µl in 90 µl Eluent gelöst (95 % H₂O + 0,01 % Ameisensäure + 5 % ACN mit 0,01 % Ameisensäure) und der relative Bortezomibgehalt mittels UPLC/MS/MS quantifiziert. Es kam zu keiner Extraktion von Bortezomib (Durchbruch der Substanz), durch die im Extraktionsprozess verwendete 0,1 M HCl, sowie dem 5 %-igen MeOH.

Vor der Validierung wurden zunächst Triplikate von Zellpellets von 5×10^4 P388 Zellen für 10 min bzw. 48 h mit 5 nM Bortezomib exponiert. Ebenfalls wurden je zwei Leerpellets von MSC und Osteoblasten mit der dem LLOQ entsprechenden (0,5 pg/100 µl bzw. 13 pM) Lösung gespiked. Die Proben wurden mittels SPE extrahiert und durch die etablierte UPLC/MS/MS Methode quantifiziert.

Ergebnisse

Alle Proben lagen über dem LLOQ und zeigten geringe Schwankungen ($\pm 15\%$) innerhalb der Triplikate bzw. Duplikate.

Die UPLC/MS/MS-Methode zur Quantifizierung von Bortezomib mit vorangehender SPE wurde nach den geltenden Richtlinien zur bioanalytischen Methodenvvalidierung nach FDA und EMA (FDA, 2018; EMA, 2011) validiert. Präzision und Genauigkeit der Methode wurden in drei unabhängigen Validierungsreihen mit drei verschiedenen QC Verdünnungen (QC A, QC B, QC C, QC D), sowie der Konzentration des 13 pM LLOQ durch Sechsfach-Bestimmung ermittelt. Beide Qualitätsparameter wurden innerhalb der einzelnen Validierungsversuche (*within-batch*) und im Vergleich zwischen den Validierungsversuchen (*batch-to-batch*) berechnet. Diese erfüllten die geforderten Kriterien von $\pm 15\%$ Abweichung für die QC Proben und $\pm 20\%$ für die LLOQ Konzentrationen (siehe **Tabelle 26**).

Tabelle 26: Übersicht der Ergebnisse der Validierung der *solid phase extraction* Methode für Bortezomib in Zellkulturüberständen und Zellpellets

		Matrix									
		Zellkulturüberstand [pg pro 100 µl]					Zellpellet [pg/Zellpellet]				
		QC A	QC B	QC C	QC D	LLOQ	QC A	QC B	QC C	QC D	LLOQ
		2,05	272	698	7,26	0,50	2,05	272	698	7,26	0,50
Within-batch											
1	Mittelwert	1,85	270	694	6,97	0,53	1,91	292	707	7,00	0,51
	Genauigkeit [%]	8,34	2,02	2,07	6,37	5,97	4,23	0,85	1,72	5,72	9,68
	Präzision [% VarK]	9,63	0,60	5,62	3,99	6,40	6,77	7,22	1,25	3,60	1,80
2	Mittelwert	2,13	274	691	7,24	0,46	1,86	223	708	6,86	0,44
	Genauigkeit [%]	5,95	2,96	1,34	3,69	11,82	3,08	2,94	1,33	3,16	3,80
	Präzision [% VarK]	3,95	0,59	0,95	0,29	8,53	9,49	17,9	1,49	5,53	12,4
3	Mittelwert	2,07	270	713	7,75	0,58	2,16	289	710	7,15	0,55
	Genauigkeit [%]	5,84	3,30	3,32	3,74	10,4	6,96	3,33	0,95	4,81	8,76
	Präzision [% VarK]	0,90	0,68	2,24	6,79	15,77	5,55	6,11	1,77	1,50	9,83
Batch-to-batch											
	Mittelwert	2,01	271	698	7,30	0,52	1,97	290	707	6,97	0,49
	Genauigkeit [%]	9,02	2,71	2,68	6,36	13,5	8,31	2,27	1,30	4,77	12,3
	Präzision [% VarK]	1,91	0,23	0,13	0,52	3,69	4,11	6,60	1,42	3,94	1,02

In Tabelle 26 sind die Mittelwerte, Genauigkeit [%] und Präzision [Variationskoeffizient, %VarK] innerhalb (*within-batch*) und zwischen (*batch-to-batch*) den 3 Validierungsreihen gezeigt.

3.3 Bestimmung der intra- und extrazellulären Bortezomibkonzentration in primären Myelomzellen, MSC und Osteoblasten

Zur Klärung der Fragestellung, ob Sensitivitätsunterschiede auf eine unterschiedliche zelluläre Pharmakokinetik zurückzuführen sind, wurden zunächst intra- und extrazelluläre Bortezomibkonzentrationen in primären malignen Plasmazellen, den Osteoblasten, sowie deren Vorläuferzellen (MSC) aus gesunden Normalspendern und Patienten mit Multiplem Myelom quantifiziert. Die Zellen wurden hierzu *in vitro* mit 5 nM Bortezomib exponiert (10 min, 1 h, 2 h, 6 h, 24 h und 48 h) und die zelluläre Pharmakokinetik mittels UPLC/MS/MS über einen Zeitraum von 24 bzw. 48 h bestimmt. Außerdem wurde untersucht, ob sich die Aufnahmekinetik von Bortezomib in MSC und Osteoblasten von gesunden Normalspendern bzw. Myelom-Patienten unterscheidet.

3.3.1 Intra- und extrazelluläre Bortezomibkonzentration in primären Myelomzellen

Bezogen auf die extrazelluläre Bortezomibkonzentration lag die intrazelluläre Bortezomibkonzentration zu allen Expositionszeitpunkten mit Ausnahme eines Spenders deutlich (11-54-fach) über der im Kulturüberstand bestimmten Bortezomibkonzentration, was auf eine Anreicherung in den Zellen schließen lässt (**Abbildung 19**). In 7 von 9 der getesteten primären Myelomzellen wurde die maximale Bortezomibkonzentration nach 4-stündiger Exposition erreicht, wobei diese zwischen 41-104 nM variierte. Nach 24 h Bortezomib-Exposition nahm bei 2 Proben die intrazelluläre Konzentration wieder deutlich (Patient M4 um 55 nM und Patient M9 um 162 nM) ab, wohingegen bei den weiteren Proben nur eine geringe Abnahme um maximal 0,6 nM der intrazellulären Akkumulation festgestellt wurde.

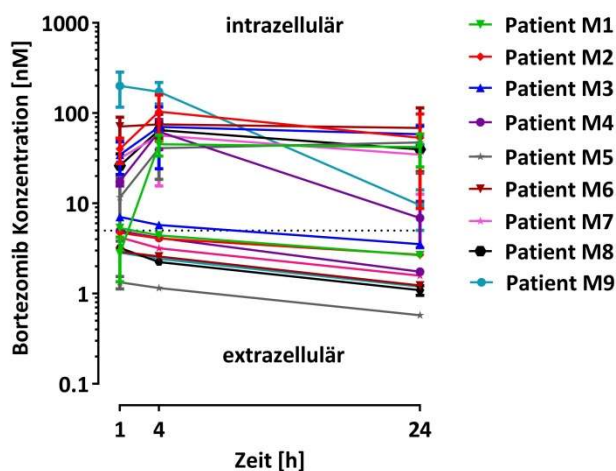


Abbildung 19: Bortezomibkonzentration [nM] in Zellpellets primärer Myelomzellen und korrespondierendem Zellkulturüberständen nach 1 h, 4 h und 24 h Exposition gegenüber 5 nM Bortezomib (gestrichelte Linie). Gezeigt sind die Mittelwerte \pm Standardabweichung für $n = 3$ Messwerte der intra- und extrazellulären

Bortezomibkonzentration primärer Myelomzellen unbehandelter Patienten ($n = 9$). Die Zellen reichern Bortezomib intrazellulär an (11-54-fache intrazelluläre Anreicherung gegenüber dem Extrazellulärraum) und erreichen die maximale intrazelluläre Konzentration (C_{\max}) nach 4 h. Die Messwerte hatte nur geringe interindividuelle Streuung ($C_{\max} = 45\text{-}201\text{ nM}$).

3.3.2 Zelluläre Pharmakokinetik in MSC von Normalspendern und Patienten mit therapiepflichtigem Multiplen Myelom

In MSC von Normalspendern und Patienten kam es ebenfalls, wie bereits in Multiplen Myelomzellen gezeigt, in Abhängigkeit der Expositionszeit zu einer hohen intrazellulären Bortezomib-Anreicherung (**Abbildung 19** und **20**). Die zelluläre Kinetik der ersten 6 h zeigte eine starke Zunahme der Bortezomib-Konzentration. Danach verblieb die intrazelluläre Konzentration auf einem stabilen Niveau. Ein relevanter Unterschied der zellulären Pharmakokinetik in MSC von Probanden und Patienten wurde nicht beobachtet.

3.3.2.1 Intra- und extrazelluläre Bortezomibkonzentration in MSC von Normalspendern

Die intra- und extrazelluläre Bortezomibanreicherung in MSC verlief bei allen acht untersuchten Normalspendern sehr homogen (**Abbildung 20 (A)**). Die maximale intrazelluläre Konzentration (C_{\max}) von 469 nM-1160 nM wurde nach 24 h Expositionszeit beobachtet. Zwischen 6 h und 48 h Expositionszeit wurde nur eine geringe Änderung der intrazellulären Bortezomibkonzentration ermittelt, wohingegen eine Abnahme der Bortezomibkonzentration im korrespondierenden Zellkulturüberstand zu sehen war.

3.3.2.2 Intra- und extrazelluläre Bortezomibkonzentration in MSC von Patienten mit therapiepflichtigem Multiplen Myelom

In den Patientenproben ergab sich ebenfalls eine wesentlich höhere intrazelluläre Bortezomibkonzentration über den gesamten Expositionszeitraum im Vergleich zur Konzentration des korrespondierenden Zellkulturüberstandes (**Abbildung 20 (B)**). Die Proben der 8 Patienten unterschieden sich interindividuell jedoch stärker in ihrer T_{\max} (4, 6, 24 und 48 h) und C_{\max} (255-2814 nM) im Vergleich zu den gemessenen Bortezomibkonzentrationen in MSC gesunder Probanden.

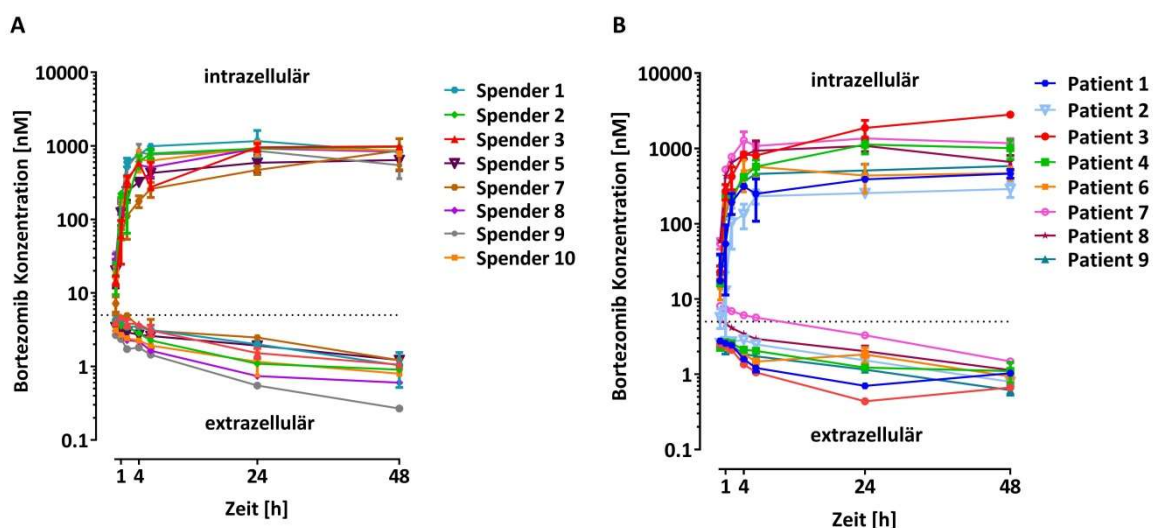


Abbildung 20: Bortezomibkonzentration [nM] in mesenchymalen Stromazellen (*mesenchymal stromal cells*, MSC) von Normalspendern bzw. Multiplen Myelom Patienten und korrespondierendem Zellkulturüberständen nach 10 min, 1 h, 2 h, 4 h, 6 h, 24 h und 48 h Exposition gegenüber 5 nM Bortezomib (gestrichelte Linie). (A) Gezeigt sind die Mittelwerte \pm Standardabweichung (SD) für mindestens $n = 3$ Messwerte der intra- und extrazellulären Bortezomib-konzentration von MSC aus Normalspendern ($n = 8$). Die Zellen zeigten eine homogene, hohe intrazelluläre Bortezomibanreicherung gegenüber dem extrazellulären Zellkulturüberstand (95-611-fache intrazelluläre Anreicherung gegenüber dem Extrazellulärraum, maximale Konzentration $C_{\max} = 565\text{-}1160$ nM). **(B)** Graphisch dargestellt sind die Mittelwerte \pm SD für $n = 3$ Messwerte der intra- und extrazellulären Bortezomibkonzentration von MSC unbehandelter Patienten mit Multiplem Myelom ($n = 8$). Die untersuchten MSC reicherten Bortezomib stark gegenüber dem Extrazellulärraum an (78-1218-fach). Die intra- und extrazellulären Konzentrationen streuten interindividuell etwas mehr im Vergleich zu den ermittelten Konzentrationen in MSC von Normalspendern und deren korrespondierendem Zellkulturüberstand (maximale intrazelluläre Konzentration $C_{\max} = 288\text{-}2815$ nM).

3.3.2 Zelluläre Pharmakokinetik in Osteoblasten von Normalspendern und Patienten mit therapiepflichtigem Multiplen Myelom

In Analogie zu den bereits untersuchten MSC kam es in Osteoblasten, unabhängig von ihrem Ursprung, zu einer höheren intrazellulären Bortezomibkonzentration bezogen auf die extrazelluläre Umgebung (**Abbildung 20** und **21**). Allgemein wurden große interindividuelle Schwankungen der C_{\max} -Werte, und der Ratio zwischen extra- und intrazellulären Wirkstoffkonzentrationen im Vergleich zu MSC festgestellt. Gegenüber den korrespondierenden MSC-Proben der gleichen Probanden und Spender reicherte sich Bortezomib in Osteoblasten geringer an.

3.3.2.3 Intra- und Extrazelluläre Bortezomibkonzentration in Osteoblasten von Normalspendern

Die Anreicherung von Bortezomib in Osteoblastenpellets der 9 untersuchten Normalspender variierte deutlich (**Abbildung 21 (A)**). So unterschied sich die C_{\max} in Osteoblasten von Normalspendern um Faktor 16 (Spender 5 $C_{\max} = 75$ nM; Spender 7 $C_{\max} = 1310$ nM), was erneut die hohe interindividuelle Variabilität der Osteoblastenproben widerspiegelte.

3.3.2.4 Intra- und extrazelluläre Bortezomibkonzentration in Osteoblasten von Patienten mit therapiepflichtigem Multiplen Myelom

Wie bereits für die Osteoblasten von Normalspendern beschrieben, schwankte das Bortezomib-Aufnahmeverhalten der Osteoblastenproben von Patienten ebenfalls sehr interindividuell (**Abbildung 21 (B)**). Die ermittelten C_{\max} Werte streuten zwischen 40 nM (Patient 4) und 2128 nM (Patient 3). Ein Trend zu einer Expositionszeit-abhängigen Bortezomib-Aufnahme innerhalb der ersten 6 h Expositionszeit war erkennbar. Zeitgleich nahm die Extrazellulärkonzentration entsprechend ab.

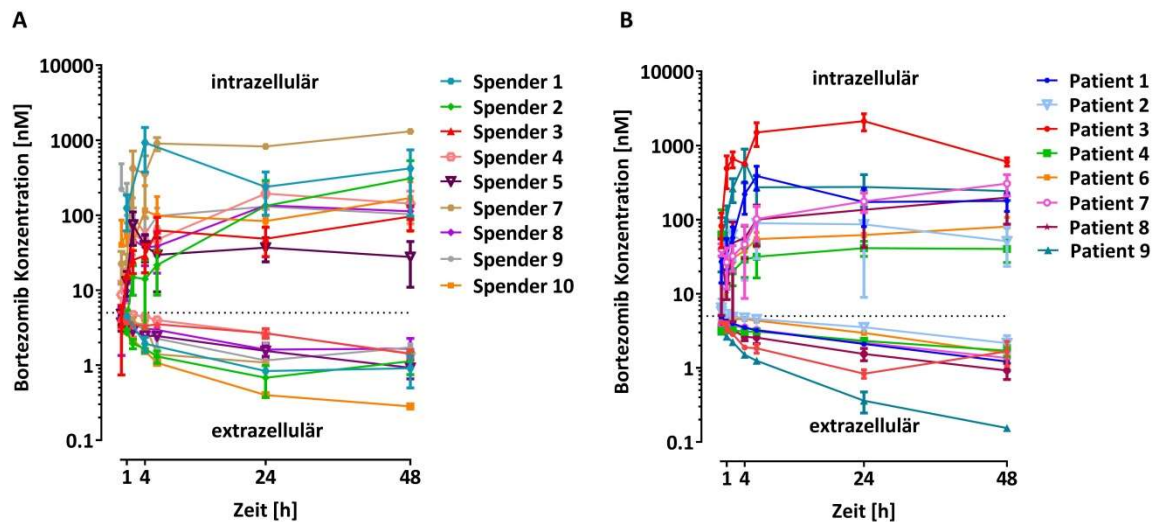


Abbildung 21: Bortezomibkonzentration [nM] in Osteoblasten von Normalspendern bzw. Myelom-Patienten und korrespondierendem Zellkulturüberständen nach 10 min, 1 h, 2 h, 4 h, 6 h, 24 h und 48 h Exposition gegenüber 5 nM Bortezomib (gestrichelte Linie). (A) Gezeigt sind die Mittelwerte \pm Standardabweichung (SD) für mindestens $n = 3$ Messwerte der intra- und extrazellulären Bortezomibkonzentration von Osteoblasten aus Normalspendern ($n = 9$). Die intrazelluläre Anreicherung gegenüber dem Extrazellulärraum in den untersuchten Osteoblasten und deren korrespondierendem Überstand variierte interindividuell stark (17-354-fache Anreicherung intrazellulär vs. extrazellulär, maximale intrazelluläre Konzentration $C_{\max} = 75$ -927 nM). (B) Graphisch dargestellt sind die Mittelwerte \pm SD für $n = 3$ Messwerte der intra- und extrazellulären Bortezomibkonzentration von Osteoblasten aus unbehandelten Patienten mit Multiplem Myelom ($n = 8$). Die intrazelluläre Bortezomibanreicherung in Osteoblasten von Patienten streute ebenfalls über einen großen Konzentrationsbereich (15-803-fache Anreicherung intrazellulär vs. extrazellulär, maximale intrazelluläre Konzentration $C_{\max} = 41$ -2127 nM).

3.3.3 Vergleich der intrazellulären Bortezomibkonzentration über den Zeitraum von 24 h

Abbildung 22 fasst die gesamten intra- und extrazellulären Konzentrationsänderungen ($AUC_{1-24\text{ h}}$) der verschiedenen Proben zusammen. Die intrazelluläre Bortezomibanreicherung in primären Multiplen Myelomzellen (Median = 1184 nM \times 24 h) war im Vergleich zu den MSC oder Multiplen Myelomzelllinien (Median = 17763 nM \times 24 h) signifikant kleiner. MSC Zellen von Probanden und Patienten (**Abbildung 22**, blau) akkumulierten Bortezomib in vergleichbarem Ausmaß (AUC Median 16443 nM \times 24 h vs. 13285 nM \times 24 h), jedoch deutlich ausgeprägter als die korrespondierenden Osteoblasten (mediane AUCs Normalspender 2225 nM \times 24h vs. 3075 nM \times 24h in Patienten) (**Abbildung 22**, rot). Die extrazellulären AUCs lagen alle in vergleichbaren Bereichen (maximale Abweichung von 24 nM \times 24 h).

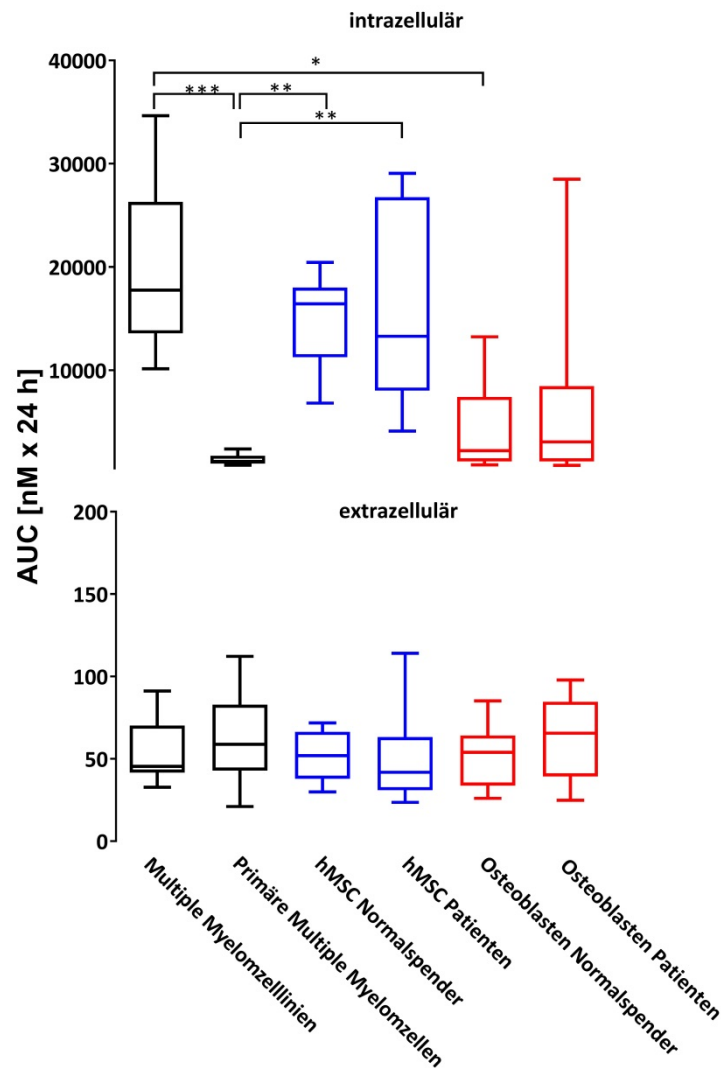


Abbildung 22: *Area under the curve* (AUC) [nM x 24 h] der intra- und extrazellulären Bortezomibkonzentration von Myelomzelllinien, primärer Myelomzellen, sowie mesenchymaler Stromazellen (*mesenchymal stromal cells*, MSC), als auch Osteoblasten von Normalspendern und unbehandelter Patienten mit Multiplen Myelom über einen Expositionszeitraum von 24 h mit 5 nM Bortezomib. Dargestellt sind die medianen AUCs der intra- und extrazellulären Bortezomibkonzentrationen und deren Minima und Maxima. Die AUCs wurden berechnet aus der Bortezomibquantifizierung in Zellpellets von Multiplen Myelomzelllinien (n = 9) und primären Multiplen Myelomzellen von Patienten (n = 9) (schwarz), MSC von Normalspendern (n = 8) und Patienten (n = 8) mit Multiplen Myelom (blau), Osteoblasten von Normalspendern (n = 9) und Patienten (n = 8) (rot) und deren korrespondierendem Zellkulturmedium. Die stärkste intrazelluläre Anreicherung wurde in den Multiplen Myelomzelllinien quantifiziert, wohingegen die niedrigste Akkumulation von Bortezomib in den primären Myelomzellen bestimmt wurde. MSC von Normalspendern und Patienten zeigten mit den Multiplen Myelomzellen vergleichbare mediane AUCs, die unabhängig von ihrem Ursprung signifikant höher als in den untersuchten primären Multiplen Myelomzellen waren. Ebenfalls im Vergleich zu der hohen intrazellulären Konzentration in MSC und Multiplen Myelomzelllinien wurde in Osteoblasten von Normalspendern und Patienten nur geringe mediane AUCs der intrazellulären Bortezomibkonzentrationen ermittelt. Die extrazellulären AUCs lagen alle in vergleichbaren Konzentrationsbereichen. Die statistische Analyse wurde mittels Kruskal-Wallis Test mit *post hoc Dunn's multiple comparison* Test durchgeführt.

3.4 Einfluss von Bortezomib auf die Zellviabilität von MSC und Osteoblasten

Im Kontext eines *in vivo* Bortezomib-freisetzenden Knochenersatzmaterials sollte eine Wirkstoffkonzentration gefunden werden, die auf Multiple Myelomzellen apoptotisch wirkt, gesunde in der Knochenumgebung vorhandene MSC und Osteoblasten jedoch nicht in ihrer Viabilität beeinflusst. Da Patienten, die mit einem Bortezomib-freisetzenden Knochenersatz-material versorgt werden, anhaltend mit dem Wirkstoff (lokal) exponiert sind, wurde neben der *in vitro* meist üblichen Expositionszeit von 48 h auch eine verlängerte Expositionszeit von 5 Tagen untersucht. Zudem ist bekannt, dass in experimentellen Untersuchungen viele Antineoplastika Apoptose nur zeitverzögert (nach 3-6 Tagen) induzieren können (Eastman, 2017). In diesen Fällen verbleiben die Zellen zunächst im Zellzyklusarrest, d.h. Reparaturmechanismen setzen ein, bevor das Gleichgewicht letztendlich zugunsten der Apoptose verschoben und der Zelltod eingeleitet wird. Daher wurden zelluläre Sensitivitätsunterschiede gegenüber Bortezomib in MSC und Osteoblasten durch Viabilitätsassays unter variierender Konzentration, sowie unterschiedlicher Expositionszeit (48 h und 5 Tagen) ermittelt.

3.4.1 Konzentrations-abhängiger Einfluss von Bortezomib auf die Zellviabilität von MSC und Osteoblasten nach 48 h Exposition

Unabhängig davon, ob es sich um MSC gesunder Probanden oder Patienten handelte, wurden diese über den Expositionszeitraum von 48 h nur in sehr hohen Bortezomibkonzentrationen moderat in ihrer Zellviabilität eingeschränkt (**Abbildung 23**). Die Inkubation der MSC über 48 h mit 500 μ M Bortezomib führten zu einer moderat Konzentrations-abhängigen Reduktion der Zellviabilität im Mittel um maximal 34 % Normalspendern ($n = 8$) und 38 % in Patienten ($n = 8$) (Rohdaten der Viabilitätsassays der MSC von Normalspendern und Patienten siehe **Anhang 7.1.1 Abbildung A.1 und A.2**).

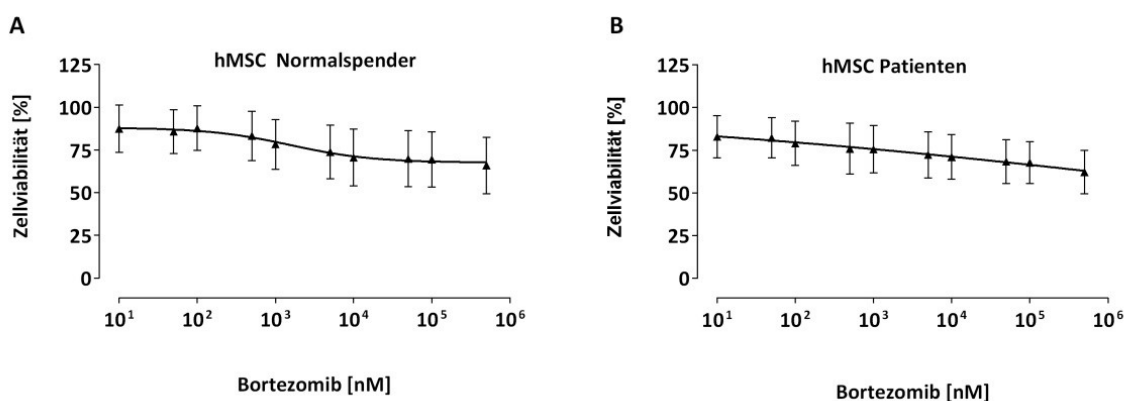


Abbildung 23: Konzentrations-abhängiger Einfluss von Bortezomib auf die Zellviabilität [%] von mesenchymalen Stromazellen (mesenchymal stromal cells, MSC) gesunder Normalspender und Patienten mit Multiplem Myelom nach 48 h Exposition. MSC von (A) Normalspendern (n = 8) und (B) Patienten mit Multiplem Myelom (n = 8) wurden für 48 h mit 0,01-500 µM Bortezomib exponiert. Die gezeigten Daten entsprechen dem Mittelwert ± Standardabweichung von n = 24 Einzelwerten (3 biologische Replikate; jede Konzentration in 8 technischen Replikaten). MSC von Normalspendern und Patienten zeigten nur eine moderate Reduktion der Zellviabilität bei sehr hohen Bortezomibkonzentrationen.

Ausdifferenzierte Osteoblasten von Probanden (n = 4) und Patienten (n = 5) zeigten ebenfalls bei sehr hohen Bortezomibkonzentrationen (500 µM) eine 50 %-ige Reduktion der Zellviabilität nach 48 h (**Abbildung 24**). 500 µM Bortezomib reduzierten im Mittel maximal die Viabilität in den Osteoblasten der Normalspender um 46 % und in Patienten um 47 % (Rohdaten der Viabilitätsassays der MSC von Normalspendern und Patienten siehe **Anhang 7.1.2, Abbildung A.3 und A.4**).

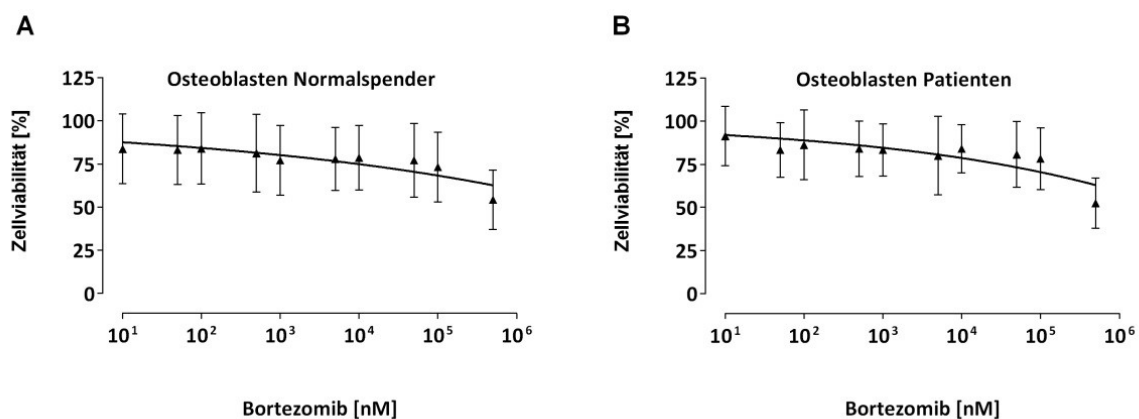


Abbildung 24: Konzentrations-abhängiger Einfluss von Bortezomib auf die Zellviabilität [%] von Osteoblasten gesunder Normalspender und Patienten mit Multiplem Myelom nach 48 h Exposition. Osteoblasten von (A) Normalspendern (n = 4) und (B) Patienten mit Multiplem Myelom (n = 5) wurden für 48 h mit 0,01-500 µM Bortezomib exponiert. Die gezeigten Daten entsprechen dem Mittelwert ± Standardabweichung von n = 24 Einzelwerten (3 biologische Replikate; jede Konzentration in 8 technischen Replikaten). Osteoblasten von Normalspendern und Patienten zeigten nur bei sehr hohen Konzentrationen eine Reduktion der Zellviabilität.

3.4.2 Konzentrations-abhängiger Einfluss von Bortezomib auf die Zellviabilität von MSC nach 5 Tagen Exposition

Eine Verlängerung der Expositionszeit auf 5 Tage zeigte in Vorversuchen eine apoptotische Wirkung auf MSC im gesamten zuvor eingesetzten Konzentrationsbereich von 10 nM bis 500 µM (*Daten nicht gezeigt*). Zur Bestimmung der IC₅₀ von Bortezomib nach 5 Tagen wurden die Zellen daher mit aufsteigenden Konzentrationen von 5 pM bis zu 100 nM inkubiert. Aufgrund der limitierten Zellzahlen wurde der Konzentrations-abhängige Einfluss von Bortezomib nach 5 Tagen Expositionszeit nur in MSC von n = 2 Normalspendern und n = 3 Patienten mit Multiplem Myelom bestimmt. Unabhängig davon, ob es sich um MSC gesunder oder erkrankter Spender handelte, zeigten diese unterschiedlichen Sensitivitäten gegenüber Bortezomib in Bezug auf die Zellviabilität. Wie in **Abbildung 25** gezeigt führte die Exposition über 5 Tage zu einer sehr potenten Einschränkung der Zellviabilität bei Spender 2 (IC₅₀ = 0,008 nM) (**Abbildung 25, links**), wohingegen die MSC des anderen Normalspenders sich weiterhin relativ resistent gegenüber Bortezomib (Spender 7) (**Abbildung 25, rechts**) zeigten. Ähnliche Effekte wurden auch in den untersuchten MSC

Ergebnisse

von Patienten mit Multiplen Myelom gezeigt (**Abbildung 26**). Hier konnte für Bortezomib eine Konzentrations-abhängige Viabilitätsreduktion bei 2 der untersuchten Spender festgestellt werden ($IC_{50} = 2,61$ nM; Spender 4, $IC_{50} = 0,12$ nM; Spender 8). Im Gegensatz dazu wurden die MSC des Patienten 9 nicht in ihrer Viabilität durch Bortezomib beeinflusst.

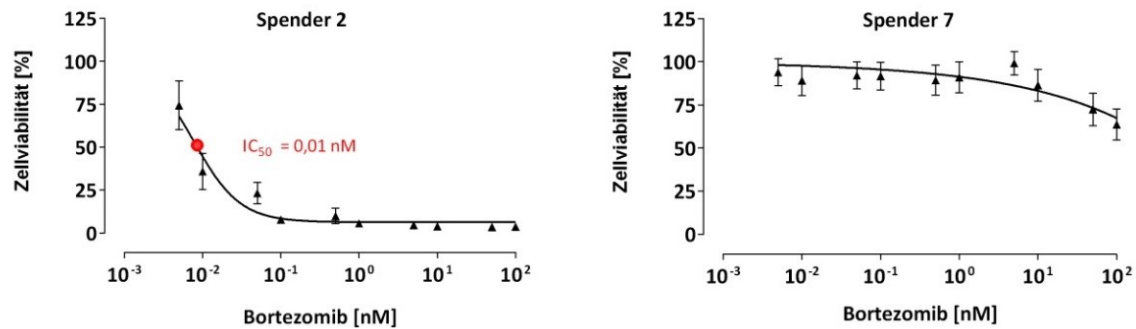


Abbildung 25: Konzentrations-abhängiger Einfluss von Bortezomib auf die Zellviabilität [%] von mesenchymalen Stromazellen (*mesenchymal stromal cells*, MSC) gesunder Normalspender nach 5 Tagen Exposition. MSC von Normalspendern ($n = 2$) wurden für 5 Tage mit 0,005-100 nM Bortezomib exponiert. Die gezeigten Daten entsprechen dem Mittelwert \pm Standardabweichung von $n = 16$ Einzelwerten (2 biologische Replikate; jede Konzentration in 8 technischen Replikaten). Die MSC des Spenders 2 wurden sehr potent in ihrer Viabilität durch Bortezomib reduziert ($IC_{50} = 0,008$ nM), wohingegen nur bei hohen Konzentrationen eine moderate Reduktion der Zellviabilität der MSC des Spenders 7 gezeigt werden konnte.

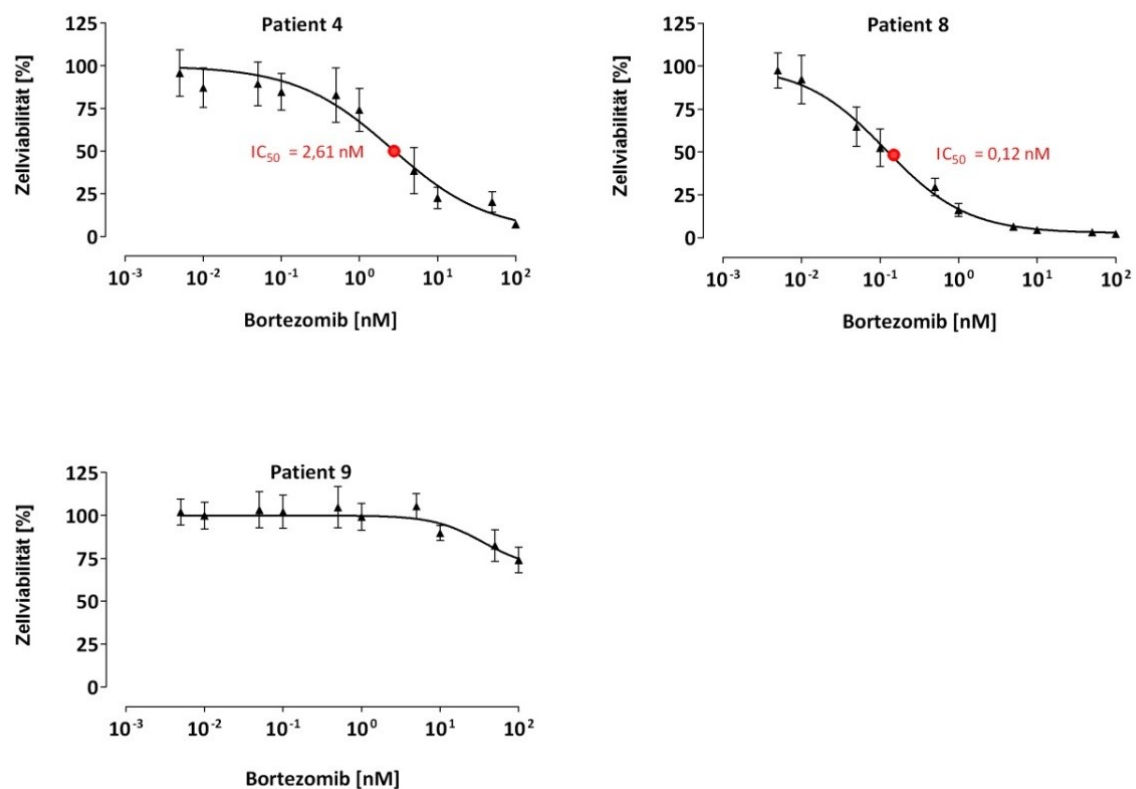


Abbildung 26: Konzentrations-abhängiger Einfluss von Bortezomib auf die Zellviabilität [%] von mesenchymalen Stromazellen (*mesenchymal stromal cells*, MSC) unbehandelter Patienten mit Multiplem Myelom nach 5 Tagen Exposition. MSC von Patienten ($n = 3$) wurden für 5 Tage mit 0,005-100 nM Bortezomib

exponiert. Die gezeigten Daten entsprechen dem Mittelwert \pm Standardabweichung von $n = 16$ Einzelwerten (2 biologische Replikate; jede Konzentration in 8 technischen Replikaten). Die MSC der Patienten 4 und 8 wurden potent in ihrer Viabilität durch Bortezomib reduziert ($IC_{50} = 2,61$ nM und $IC_{50} = 0,12$ nM), wohingegen nur bei hohen Konzentrationen eine moderate Reduktion der Zellviabilität der MSC des Patienten 9 gezeigt werden konnte.

3.5 Einfluss von Bortezomib auf die Proteasomenaktivität von MSC und Osteoblasten

Neben der zellulären Pharmakokinetik wurde auch die zelluläre Pharmakodynamik von Bortezomib in MSC und Osteoblasten von Normalspendern bzw. Patienten untersucht.

Zum einen wurde hierzu die inhibitorische Potenz (IC_{50}) von Bortezomib in MSC und Osteoblasten an der CT-, T- und C-like Proteasomenuntereinheit bestimmt. Simultan zur Quantifizierung der intrazellulären Bortezomibkonzentrationen nach 1, 6, 24 und 48 h Expositionszeit wurde auch das Ausmaß der Inhibition der drei Proteasomenuntereinheiten zu diesen distinkten Zeitpunkten bestimmt. Der Einfluss von Bortezomib auf die katalytische Proteasomenaktivität in primären Multiplen Myelomzellen unbehandelter Patienten konnte aufgrund der limitierten Zellzahl und begrenzten Kultivierbarkeit *in vitro* nicht bestimmt werden.

3.5.1 Bestimmung der inhibitorischen Potenz von Bortezomib auf die katalytische Aktivität der Proteasomenuntereinheiten in MSC und Osteoblasten

In MSC, unabhängig von ihrem Ursprung, wurde die Aktivität der CT-like Untereinheit durch Bortezomib sehr potent inhibiert (siehe **Tabelle 27** und **28**). Die IC_{50} -Werte variierten hier zwischen 470 pM (Spender 5) und 55,5 nM (Patient 2). Simultan zur Hemmung der CT-like Untereinheit stieg in allen MSC-Zellen die katalytische Aktivität der T-like Proteasomen-untereinheit zunächst an (siehe exemplarisch **Abbildung 27**), weshalb für diese Untereinheit keine Berechnung von IC_{50} -Werten möglich war. Die maximale Steigerung der Aktivität betrug 182 % (Spender 3) bei Exposition mit 50 nM Bortezomib im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle. Die Peptidspaltungsaktivität der C-like Untereinheit wurde in MSC durch Bortezomib nur mit geringer Potenz, allerdings deutlichen interindividuellen Unterschieden gehemmt (IC_{50} von 71,6 nM (Spender 5) bis zu 153 nM (Patient 8)). Die IC_{50} -Werte der CT- und C-like Proteasomenuntereinheiten in Zellen von Patienten und Probanden unterschieden sich im Mittel um 11 nM (CT-like Proteasomenuntereinheit) bzw. 12 nM (C-like Proteasomenuntereinheit).

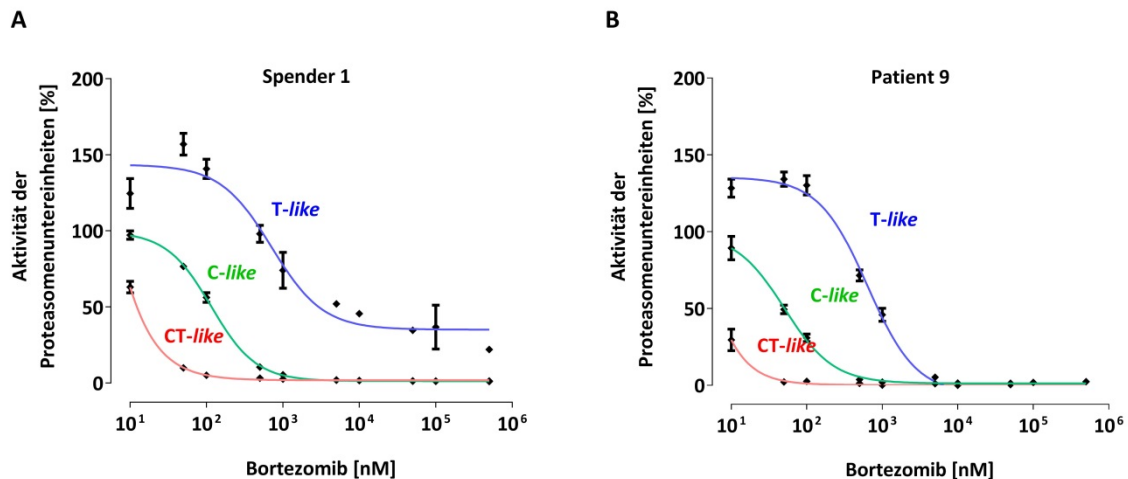


Abbildung 27: Exemplarische Darstellung der Bortezomibkonzentrations-abhängigen Inhibition der Aktivität der CT-, T- und C-like Proteasomenuntereinheiten [%] in mesenchymalen Stromazellen (*mesenchymal stromal cells*, MSC) des Spenders 1 und Patienten 9 nach 1-stündiger Exposition. Sowohl in den MSC des Spenders 1 (A), als auch in den MSC des Patienten 9 (B) wurde die Aktivität der CT-like Proteasomenuntereinheit unter kompensatorischer Aktivitätssteigerung der T-like Proteasomenuntereinheit nach 1-stündiger Exposition mit 0,01-500 μ M Bortezomib am wirksamsten inhibiert. Die Daten zeigen die den Mittelwert \pm Standardabweichung von 8 technischen Replikaten.

Tabelle 27: Inhibitorische Potenz (IC_{50}) von Bortezomib an den CT- und C-like Proteasomenuntereinheiten in mesenchymalen Stromazellen von Normalspendern ($n = 5$) nach 1-stündiger Exposition mit 0,01-500 μ M Bortezomib

Normalspender	IC_{50} der CT-like Proteasomenuntereinheit [nM]	IC_{50} der C-like Proteasomenuntereinheit [nM]
Spender 1	2,39	115
Spender 2	55,5	111
Spender 3	0,75	69,5
Spender 5	0,47	71,6
Spender 10	1,09	120
Mittelwert	12,0	97,3
SD	$\pm 21,7$	$\pm 22,1$

Tabelle 28: Inhibitorische Potenz (IC_{50}) von Bortezomib an den CT- und C-like Proteasomenuntereinheiten in mesenchymalen Stromazellen von unbehandelten Patienten mit Multiplem Myelom ($n = 6$) nach 1-stündiger Exposition mit 0,01-500 μ M Bortezomib

Patienten	IC_{50} der CT-like Proteasomenuntereinheit [nM]	IC_{50} der C-like Proteasomenuntereinheit [nM]
Patient 2	1,42	76,0
Patient 3	3,37	66,9
Patient 4	1,13	Keine Berechnung der IC_{50} möglich
Patient 7	0,89	46,54

Patient 8	0,87	153,3
Patient 9	2,35	50,49
Mittelwert	1,536	85,7
SD	± 0,94	± 40,5

Im Vergleich zu den in MSC ermittelten IC₅₀-Werten der CT-like Untereinheiten, variierten diese interindividuell stärker in Osteoblasten (50,0 pM (Patient 1) bis 76,4 nM (Spender 10)) (Tabelle 29 und 30). Im direkten Vergleich der drei Proteasomenuntereinheiten inhibierte Bortezomib dennoch die CT-like Untereinheit in allen Experimenten am potentesten. Auch in den Osteoblasten der untersuchten Spender und Probanden wurde (Ausnahme Spender 5) eine kompensatorische Steigerung der T-like Aktivität mit zunehmender Bortezomibkonzentration beobachtet (maximale Steigerung 175 % (Patient 4)). Die IC₅₀-Werte der C-like Untereinheiten zeigten ebenfalls eine größere Streuung im Vergleich zu den in MSC ermittelten Werten. Die Potenz von Bortezomib zur Inhibition der CT-like Untereinheit in Probanden unterschied sich im Mittel nur um 9nM von derer in Patienten, sowie um 34 nM für die C-like Untereinheit.

Tabelle 29: Inhibitorische Potenz (IC₅₀) von Bortezomib an den CT- und C-like Proteasomenuntereinheiten in Osteoblasten von Normalspendern (n = 6) nach 1-stündiger Exposition mit 0,01-500 µM Bortezomib

Normalspender	IC ₅₀ der CT-like Proteasomenuntereinheit [nM]	IC ₅₀ der C-like Proteasomenuntereinheit [nM]
Spender 2	0,25	153
Spender 5	29,4	79,8
Spender 6	0,29	57,3
Spender 7	1,30	53,4
Spender 9	10,6	113
Spender 10	76,4	90,6
Mittelwert	8,37	85,9
SD	± 11,2	± 40,0

Tabelle 30: Inhibitorische Potenz (IC₅₀) von Bortezomib an den CT- und C-like Proteasomenuntereinheiten Osteoblasten von unbehandelten Patienten mit Multiplem Myelom (n = 6) nach 1-stündiger Exposition mit 0,01-500 µM Bortezomib

Patienten	IC ₅₀ der CT-like Proteasomenuntereinheit [nM]	IC ₅₀ der C-like Proteasomenuntereinheit [nM]
Patient 1	0,05	146
Patient 3	0,42	113
Patient 4	27,5	180
Patient 6	9,10	98,7
Patient 7	1,00	95,7
Patient 9	0,50	36,9
Mittelwert	6,43	112
SD	± 9,94	± 44,5

Vergleicht man die IC_{50} -Werte der in MSC und Osteoblasten mit denen der in Zelllinien des Multiplen Myeloms ermittelten Werte, so zeigt sich, dass Bortezomib die CT-like Untereinheit in allen drei Zellarten mit ähnlicher Potenz inhibiert (siehe **Tabelle 31**).

Tabelle 31: Inhibitorische Potenz (IC_{50}) von Bortezomib an den CT- und C-like Proteasomenuntereinheiten in Myelomzelllinien (n = 6) nach 1-stündiger Exposition mit 0,001-10 μ M Bortezomib

Zelllinie	IC_{50} der CT-like Proteasomenuntereinheit [nM]	IC_{50} der C-like Proteasomenuntereinheit [nM]
EJM	0,57	55,5
Karpas-620	4,83	18,7
L363	18,0	75,2
LP-1	85,3	538
OPM-2	96,4	570
RPMI-8226	Keine nicht-lineare Regression möglich	4,28
Mittelwert	41,0	210
SD	$\pm 41,2$	± 244

Die mittlere IC_{50} der CT-like Untereinheit für alle Zellarten lag bei 15 ± 27 nM (siehe **Abbildung 28**). Bortezomib hemmte somit die CT-like Untereinheit mit einer vergleichbaren Potenz in Zelllinien des Multiplen Myeloms, MSC und Osteoblasten. Eine höhere Streuung der Werte ergab sich für die C-like Proteasomenuntereinheit um den Mittelwert von 120 ± 127 nM.

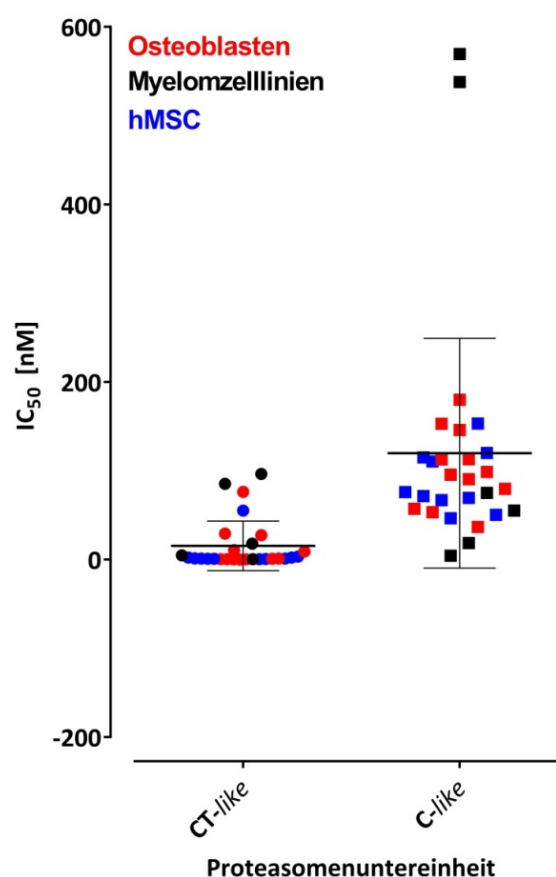


Abbildung 28: Inhibitorische Potenz (IC_{50}) [nM] von Bortezomib an den CT- und C-like Proteasomenuntereinheiten in Myelomzelllinien, mesenchymalen Stromazellen (*mesenchymal stromal cells*, MSC) und Osteoblasten. Die CT-like Proteasomenuntereinheit wurde in Myelomzelllinien ($n = 6$), MSC ($n = 11$) und Osteoblasten ($n = 12$) gesunder und mit Multiplen Myelom erkrankter Patienten am potentesten inhibiert. Die C-like Proteasomenuntereinheit wurde insgesamt schwächer in ihrer katalytischen Aktivität gehemmt, allerdings ergab sich im Vergleich zur Inhibition der CT-like Untereinheit eine höhere Streuung der IC_{50} -Werte unabhängig vom Zelltyp.

3.5.2 Einfluss der Expositionsdauer von 5 nM Bortezomib auf die Aktivität der Proteasomenuntereinheiten

Die Aktivität der drei proteasomalen Untereinheiten wurde in MSC von Probanden ($n = 8$) und Patienten ($n = 8$) nach 1 h, 6 h, 24 h und 48 h Expositionszeit (5 nM) bestimmt. Bortezomib inhibierte die CT-like Proteasomenuntereinheit, unabhängig von der Expositionszeit, in allen Proben hoch potent. Im Mittel unterschieden sich die Aktivitäten der Proteasomenuntereinheiten in MSC von Probanden und Patienten kaum (**Abbildung 29**). Im Beobachtungszeitraum bis 24 h kam es bei der Mehrheit der untersuchten Zellen zu einer Abnahme der Aktivität der CT- und C-like Untereinheit nach Exposition mit 5 nM Bortezomib. In den MSC, mit Ausnahme denen des Spenders 5, kam es zu einer Steigerung der T-like Proteasomenaktivität unter Bortezomib. Eine Hemmung dieser Untereinheit wurde zu keinem Zeitpunkt beobachtet. Nach 48-stündiger Exposition mit Bortezomib war die Proteinspaltungsaktivität der C-like Proteasomenuntereinheit sehr heterogen. Allgemein waren ähnliche Trends für die Hemmung der Proteasomenuntereinheiten nach 1 h, 6 h, 24 h und 48 h Inkubation für MSC von Probanden und Spendern zu beobachten, allerdings variierten die Ergebnisse doch stark interindividuell (siehe Anhang **Kapitel 7.2.1, Abbildung A.5 und A.6**). Aufgrund des geringen Stichprobenumfangs der unbehandelten Kontrolle, die auf experimentelle Einschränkungen in der Zellzahl zurückzuführen sind, wurden keine statistischen Analysen durchgeführt.

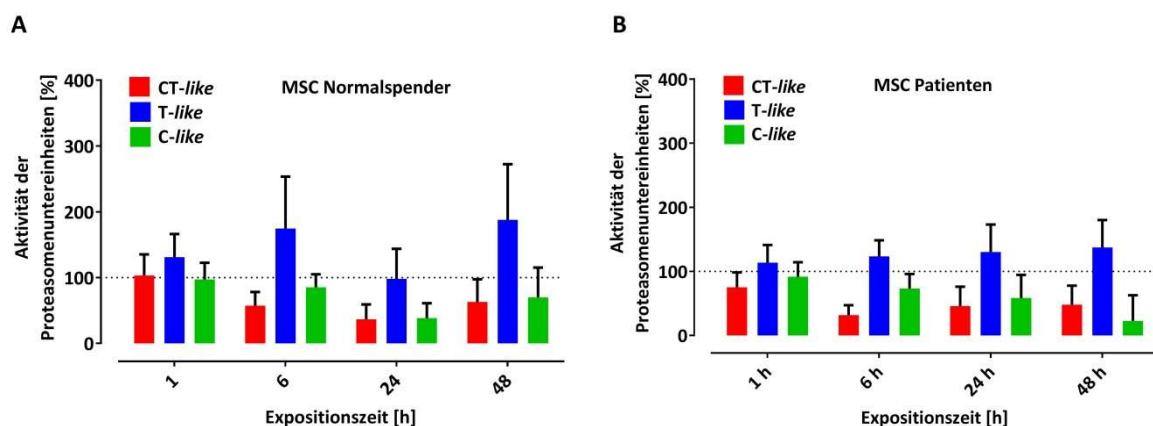


Abbildung 29: Expositionszeit-abhängige Inhibition der Aktivität katalytischen Proteasomenuntereinheiten [%] in mesenchymalen Stromazellen (*mesenchymal stromal cells*, MSC) von Normal Spendern und Patienten. Mittlere Inhibition \pm Standardabweichung der CT-, T- und C-like Proteasomenaktivität in MSC von (A) Normal Spendern ($n = 8$) und (B) Patienten mit Multiplen Myelom ($n = 8$) nach 1 h, 6 h, 24 h und 48 h Exposition mit 5 nM Bortezomib. Unabhängig von ihrem Ursprung zeigten die MSC im Mittel eine Expositionszeit-abhängige potente Reduktion der CT-like Proteasomenaktivität durch Bortezomib. Eine kompensatorische Gegenregulation der T-like Proteasomenuntereinheit wurde in MSC von Normal Spendern und Patienten beobachtet (100 % Aktivität der Proteasomenuntereinheiten = gestrichelte Linie). Die gezeigten Ergebnisse wiesen starke interindividuelle Schwankungen auf.

Auch in Osteoblasten von Normalspendern ($n = 7$) und Patienten ($n = 7$) wurde die Expositionszeit-abhängige Reduktion der Aktivität der CT-, T- und C-like Proteasomenuntereinheiten bestimmt (Daten siehe **Anhang Kapitel 7.2.2, Abbildung A.7 und A.8**). In den Osteoblasten wurde die CT-like Untereinheit durch Bortezomib zu jeder Expositionszeit am effektivsten inhibiert (**Abbildung 30**). Die mittlere CT-like Proteasomenaktivität in Osteoblasten, unabhängig von ihrem Ursprung, wurde mit zunehmender Expositionszeit bis 24 h um 68 % (Normalspender) bzw. 59 % (Patienten) reduziert. Eine Zunahme der katalytischen Aktivität der T-like Proteasomenuntereinheit wurde, mit Ausnahme des Spenders Patienten 4, zu verschiedenen Zeitpunkten in den Osteoblasten beobachtet. Die Hemmung der C-like Proteasomenuntereinheit variierte stark unter den Probanden und den Patienten. Auch hier kann durch die starken Unterschiede zwischen den einzelnen Proben nur ein Trend beschrieben werden. Auch bei der Analyse der Expositionszeit-abhängigen Inhibition der katalytischen Proteasomenuntereinheiten in Osteoblasten wurde aufgrund des geringen Stichprobenumfangs der unbehandelten Kontrolle, keine statistischen Analysen durchgeführt.

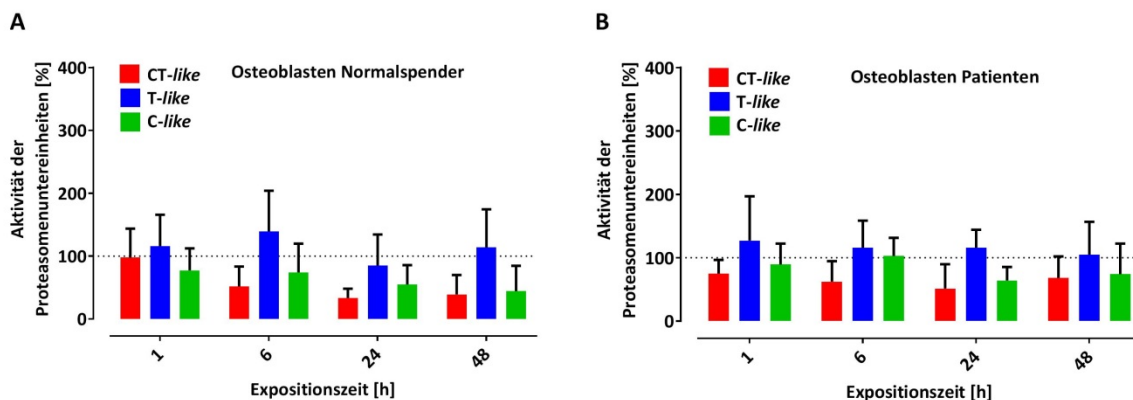


Abbildung 30: Expositionszeit-abhängige Inhibition der katalytischen Proteasomenuntereinheiten in Osteoblasten von Normalspendern und Patienten. Mittlere Inhibition \pm Standardabweichung der CT-, T- und C-like Proteasomenaktivität in Osteoblasten von (A) Normalspendern ($n = 7$) und (B) Patienten mit Multiplen Myelom ($n = 7$) nach 1 h, 6 h, 24 h und 48 h Exposition mit 5 nM Bortezomib. Unabhängig vom Ursprung der Osteoblasten wurde im Mittel die CT-like Proteasomenuntereinheit Expositionszeit-abhängig am potentesten durch Bortezomib inhibiert. Eine kompensatorische Gegenregulation der T-like Proteasomenuntereinheit wurde ebenfalls in Osteoblasten von Normalspendern und Patienten beobachtet (100 % Aktivität der Proteasomenuntereinheiten = gestrichelte Linie). Die gezeigten Ergebnisse wiesen starke interindividuelle Schwankungen auf.

3.6 Zusammenhang zwischen der Expression der enzymatischen Proteasomenuntereinheiten und der Wirksamkeit von Bortezomib in Bezug auf die Reduktion der Zellviabilität und Aktivität der katalytischen Proteasomenuntereinheiten

Zur Beschreibung der zellulären Pharmakodynamik ist es unzureichend, nur die Konzentrations-Wirkungs- oder Expositionszeit-Wirkungs-Beziehung an der jeweiligen Zielstruktur zu untersuchen. Die Sensitivität gegenüber Bortezomib kann auch davon abhängen, wieviel Proteasom intrazellulär exprimiert wird (Bianchi et al., 2009). Darüber hinaus kann die Anzahl der *targets* auch das Gleichgewicht zwischen der intra- und extrazellulären Bortezomibkonzentration bestimmen.

Zunächst wurde die Expression der konstitutiven, wie auch Immun-Proteasomenuntereinheiten mittels GEP in folgenden Zellen bestimmt: (1) Zelllinien des Multiplen Myeloms (n = 9), (2) primären normalen Plasmazellen, MSC und Osteoblasten gesunder Spender (n = 19) und (3) malignen Plasmazellen, MSC und Osteoblasten therapiepflichtiger (n = 765), refraktärer bzw. rezidivierender Patienten mit Multiplem Myelom (n = 90). Die erhaltenen Expressionsmuster der Zelllinien des Multiplen Myeloms wurden im Anschluss zum einen mit der intrazellulären Akkumulation, zum anderen mit der inhibitorischen Potenz an den Proteasomenuntereinheiten von Bortezomib verglichen, um ggf. Zusammenhänge zu erfassen. Zur Klärung einer möglichen Beeinflussung des Therapieerfolgs durch unterschiedliche Expressionsstärken der Proteasomenuntereinheiten wurden die GEP-Daten der malignen Plasmazellen therapiepflichtiger Multiplen Myelom Patienten mit deren Wahrscheinlichkeit für ein ereignisfreies Überleben und auch Gesamtüberleben in Bezug gesetzt.

3.6.1 Expression der Proteasomenuntereinheiten in Zelllinien des Multiplen Myeloms, Patienten mit Multiplem Myelom, MSC und Osteoblasten

Die Expressionshöhe der CT-like Untereinheit hatte nur eine geringe Schwankungsbreite zwischen den Zelllinien und war im Vergleich zur CT_i-like Untereinheit stärker exprimiert (**Abbildung 31**). Auch die T-like, C-like Proteasomenuntereinheiten hatten ähnliche Expressionshöhen und nur wenig Schwankungsbreite im Vergleich zwischen den untersuchten Zelllinien.

Die CT_i-like und C_i-like Proteasomenuntereinheit zeigten ebenfalls ein homogenes Expressionsmuster, wohingegen die Expression der T_i-like Proteasomenuntereinheit in den untersuchten Zelllinien stärker variierte. Generell wurden die drei Immunproteasomenuntereinheiten am stärksten in den Zelllinien RPMI-8226 und am schwächsten in KMS-12-BM exprimiert. Im direkten Vergleich der drei katalytischen Funktionseinheiten war die des Immunproteasoms im Mittel schwächer in den untersuchten Zelllinien exprimiert.

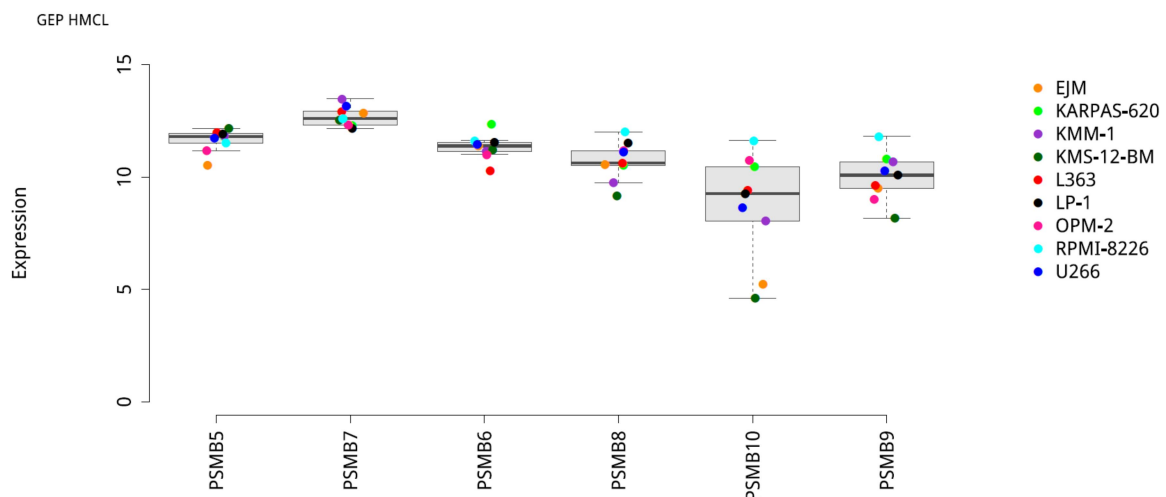


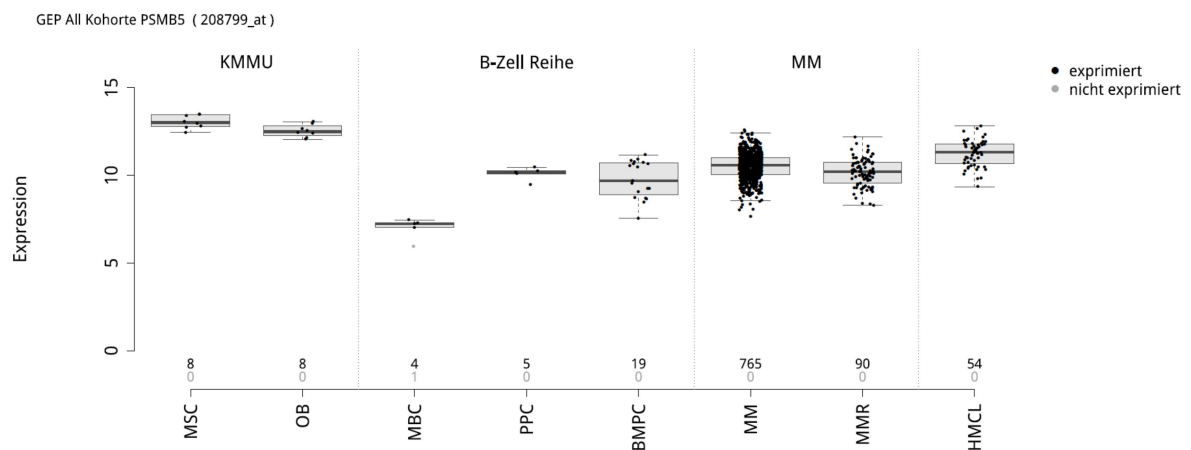
Abbildung 31: Relative Expressionsstärke der katalytischen Untereinheiten des konstitutiven und Immun-Proteasoms in Myelomzelllinien. Mittels *gene expression profiling* (GEP) wurden Myelomzelllinien (HMCL, n = 9) auf die relative Expressionsstärke der CT- (PSMB5), T- (PSMB7), C- (PSMB6), CT_i- (PSMB8), T_i- (PSMB10) und C_i-like (PSMB9) Proteasomenuntereinheiten untersucht. Die Zellen wiesen interindividuell in der Expressionsstärke nur eine geringe Schwankungsbreite auf. Die konstitutiven und Immun-Proteasomenuntereinheiten wurden von allen untersuchten Zelllinien exprimiert. Die relative Expressionsstärke der konstitutiven Proteasomenuntereinheiten war etwas höher im Vergleich zu den Immun-

Ergebnisse

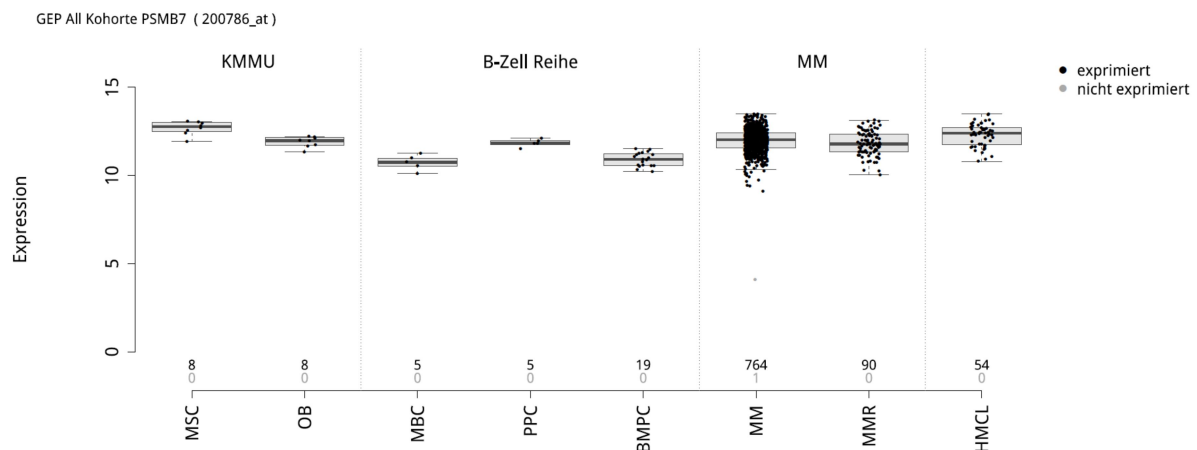
Proteasomenuntereinheiten. Zur Unterscheidung „exprimiert/nicht exprimiert“ wurde eine Berechnung mittels PANP-Algorithmus durchgeführt.

In der untersuchten Patientenkohorte mit unbehandeltem therapiepflichtigem oder rezidivierendem Multiplem Myelom und gesunden Probanden waren die CT-, T- und C-like Proteasomenuntereinheiten in allen untersuchten normalen und malignen Plasmazellen und Zellen der Knochenmark-Mikroumgebung exprimiert (**Abbildung 32**). Die Expressionsstärke war für die Zellen von Patienten mit Multiplem Myelom bzw. Zellen von rezidivierenden/refraktären Multiplem Myelom Patienten mit denen der untersuchten Zelllinien vergleichbar. Diese Ergebnisse wurden ebenfalls für die CT_i- und C_i-like Untereinheiten bestätigt, wohingegen in 5 der Proben der Patienten mit Multiplem Myelom bzw. 3 der Patienten mit rezidiviertem/refraktärem Multiplem Myelom keine Expression für die T_i-like Proteasomenuntereinheiten mittels GEP nachgewiesen werden konnte (**Abbildung 33**).

A



B



C

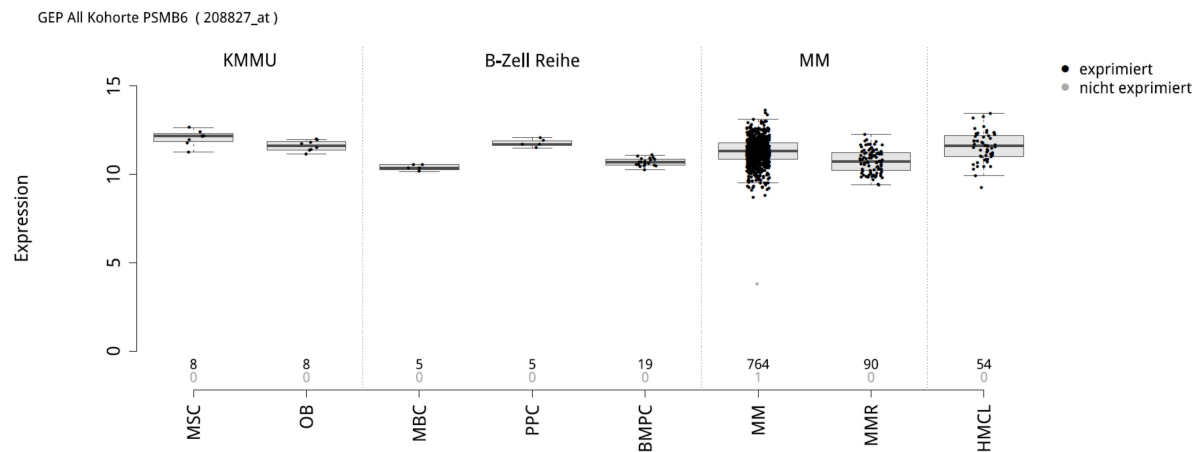
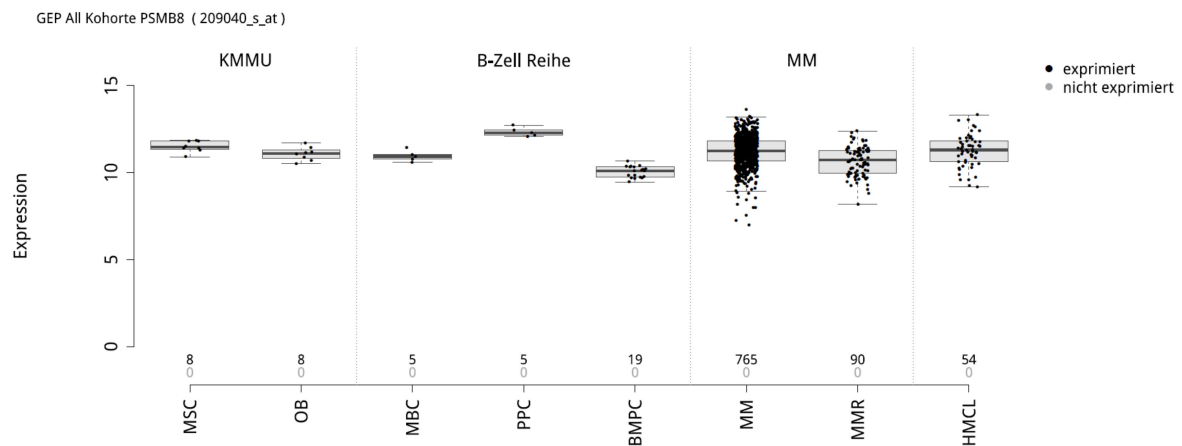


Abbildung 32: Relative Expressionsstärke der katalytischen Untereinheiten des konstitutiven Proteasoms in primären normalen und malignen Plasmazellen, sowie der Knochenmark-Mikroumgebung (KMMU). Durch *gene expression profiling* (GEP) wurden in mesenchymalen Stromazellen (*mesenchymal stromal cells*, MSC) (n = 8), Osteoblasten (OB, n = 8), gesunden Plasmazellen (Gedächtnis-B-Zellen (MBC, n = 4), polyklonalen plasmablastischen Zellen (PPC, n = 5), Plasmazellen des Knochenmarks (BMPC, n = 19)) gesunder Spender, Myelomzellen von Patienten mit neudiagnostiziertem, therapiepflichtigem Multiplen Myelom (MM; n = 765) und rezidiertem/refraktärem Multiplen Myelom Patienten (MMR, n = 90) und humanen Myelomzelllinien (HMCL n = 54) die relative Expressionsstärke der (A) CT- (PSMB5), (B) T- (PSMB7) und (C) C-like (PSMB6), Proteasomenuntereinheiten bestimmt. Die katalytisch aktiven, konstitutiven Proteasomenuntereinheiten wurden in allen untersuchten Zelltypen exprimiert. Die relative Expressionsstärke der malignen Plasmazellen war mit der in HMCL vergleichbar. Zur Unterscheidung „exprimiert (schwarz)/nicht exprimiert (grau)“ wurde eine Berechnung mittels PANP-Algorithmus durchgeführt.

A



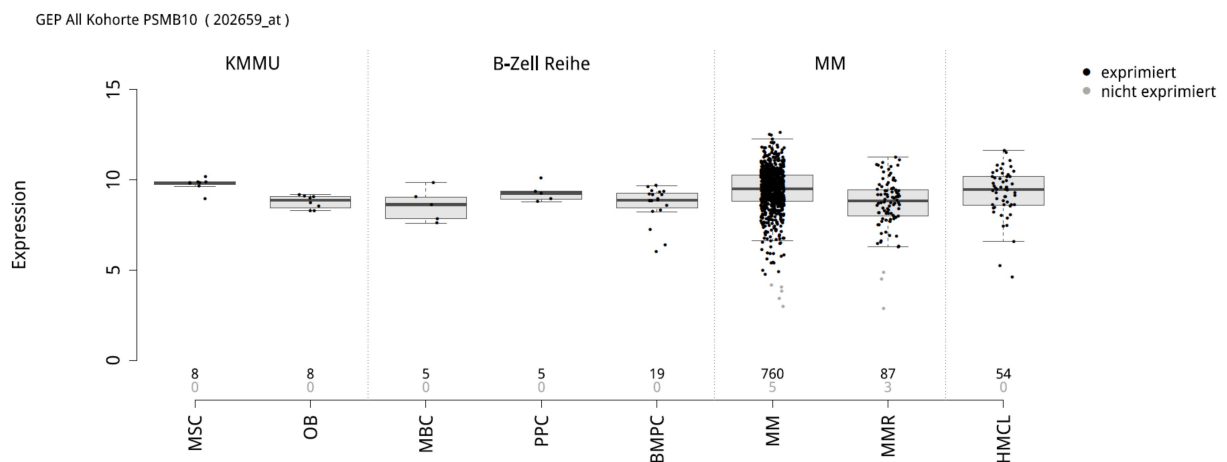
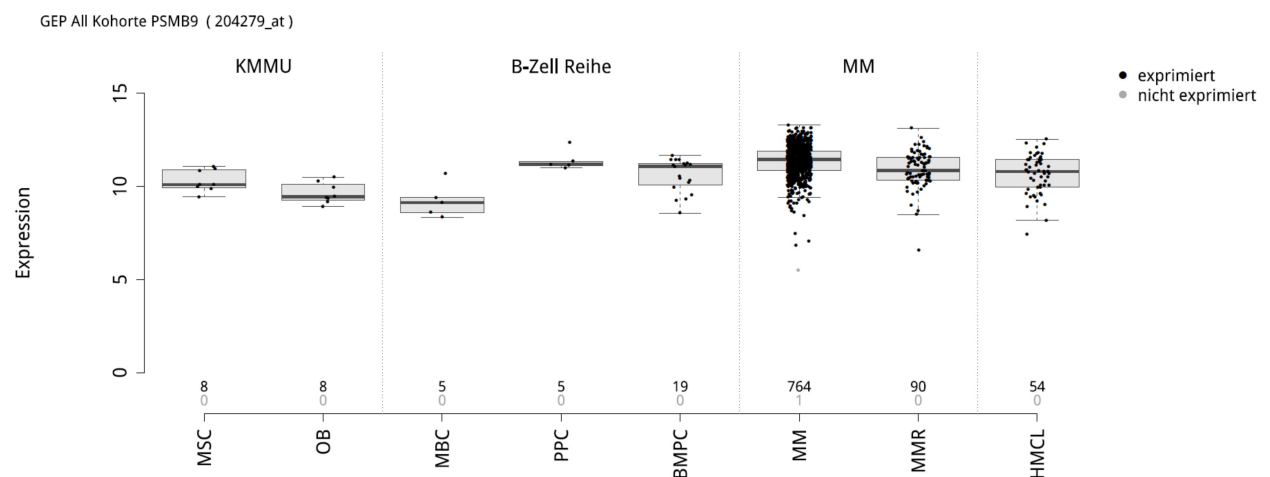
B**C**

Abbildung 33: Relative Expressionsstärke der katalytischen Untereinheiten des Immun-Proteasoms in primären normalen und malignen Plasmazellen, sowie der Knochenmark-Mikroumgebung (KMMU). Durch *gene expression profiling* (GEP) wurden in mesenchymalen Stromazellen (*mesenchymal stromal cells*, MSC) (n = 8), Osteoblasten (OB, n = 8), normalen Plasmazellen (Gedächtnis-B-Zellen (MBC, n = 4), polyklonalen plasmablastischen Zellen (PPC, n = 5) Plasmazellen des Knochenmarks (BMPC, n = 19)) gesunder Spender, Myelomzellen von Patienten mit neudiagnostiziertem, therapiepflichtigem Multiplem Myelom (MM; n = 765) und rezidiertem/refraktärem und humanen Multiplem Myelomzelllinien (HMCL = 54) die relative Expressionsstärke der (A) CT_i- (PSMB8), (B) T_i- (PSMB10) und (C) C_i-like (PSMB9) Proteasomenuntereinheiten bestimmt. Die CT_i- und C_i-like-Proteasomen-untereinheiten wurden in allen untersuchten Zelltypen exprimiert. In 5 der Proben der Patienten mit Multiplem Myelom bzw. 3 der Patienten mit rezidivierenden/refraktären Multiplem Myelom konnte keine Expression für die T_i-like-Proteasomenuntereinheit nachgewiesen werden. Die relative Expressionsstärke der malignen Plasmazellen war mit der in HMCL vergleichbar. Zur Unterscheidung „exprimiert (schwarz)/nicht exprimiert (grau)“ wurde eine Berechnung mittels PANP-Algorithmus durchgeführt.

3.6.2 Korrelation der intrazellulären Bortezomibakkumulation mit der Expression der katalytischen Proteasomenuntereinheiten in Zelllinien des Multiplen Myeloms

Die mittels GEP erhaltene Expression der C-, T- und C-like Proteasomenuntereinheiten, wie auch die der entsprechenden Immun-Proteasomeneinheiten wurden mit dem Verhältnis von extra- und intrazellulärer Konzentration nach 6 h bzw. 24 h Exposition mit 5 nM Bortezomib der neun

getesteten Zelllinien korreliert. Zu diesen Zeitpunkten wurden die jeweils maximalen intrazellulären Bortezomibkonzentrationen in den Zelllinien ermittelt. Für die Expression der CT-, T-like, sowie CT_i-like Proteasomenuntereinheiten konnte keine Korrelation zur intrazellulären Bortezomibanreicherung nach 6 h bzw. 24 h gezeigt werden. Nach 6-stündiger Exposition mit Bortezomib korrelierte die intrazelluläre Anreicherung mit der Expression der C-like, sowie C_i-like Proteasomenuntereinheiten (**Abbildung 34**, siehe auch **Anhang Kapitel 7.3.1, Abbildung A.9**). Dies suggeriert, dass eine höhere Expression dieser Proteasomenuntereinheiten zu einer höheren Anreicherung von Bortezomib beiträgt. Diese positive Korrelation konnte auch für die T_i-like und C_i-like Proteasomenuntereinheit und die Akkumulation von Bortezomib nach 24-stündiger Exposition gezeigt werden (**Abbildung 35** siehe auch **Anhang Kapitel 7.3.1, Abbildung A.10**).

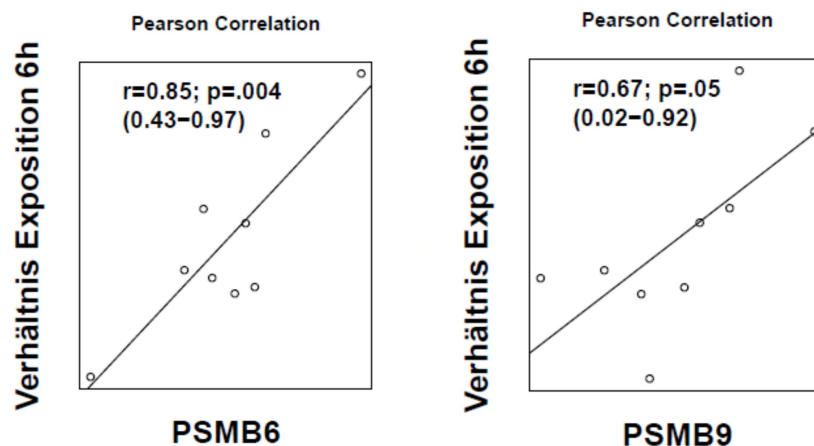


Abbildung 34: Korrelation der intrazellulären Bortezomibkonzentration nach 6 h Exposition mit 5 nM Bortezomib mit der Expression C- und C_i-like Proteasomenuntereinheiten. Zur Korrelationsanalyse wurde die Bortezomibkonzentration zum einem Zeitpunkt der maximalen Akkumulation (6 h) der Myelomzelllinien ($n = 9$) mit der durch *gene expression profiling* ermittelten Expression C- (PSMB6) und C_i-like (PSMB9) Proteasomenuntereinheiten in Bezug gesetzt. Die Expression der C- ($p = 0,004$) und C_i-like ($p = 0,05$) Proteasomenuntereinheiten korrelierte mit der intrazellulären Bortezomibakkumulation. Für alle anderen Proteasomenuntereinheiten konnte keine signifikante Korrelation ermittelt werden. Die Korrelationsanalyse erfolgte mit Hilfe der nicht-parametrischen Spearman-Korrelation.

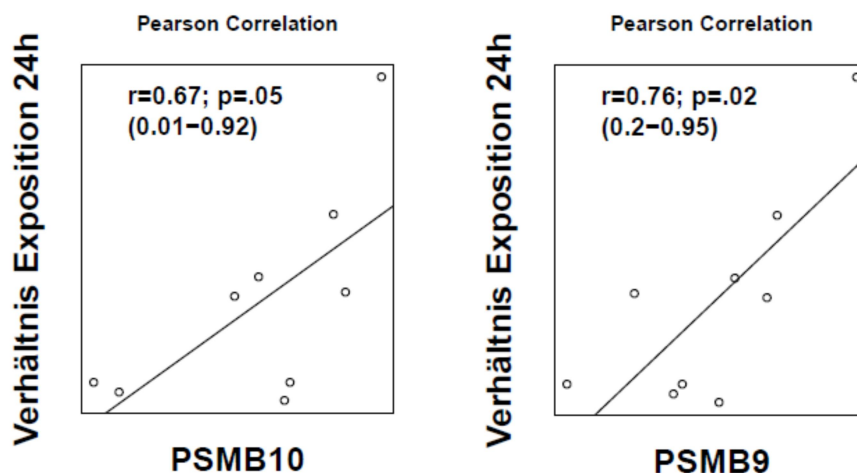


Abbildung 35: Korrelation der intrazellulären Bortezomibkonzentration in Zelllinien des Multiplen Myeloms nach 24 h Exposition mit 5 nM Bortezomib mit der Expression der T_i und C_i-like Proteasomenuntereinheiten. Zur Korrelationsanalyse wurde die Bortezomibkonzentration zu einem weiteren Zeitpunkt der maximalen Akkumulation (24 h) der Myelomzelllinien (n = 9) mit der durch *gene expression profiling* ermittelten Expression der T_i- (PSMB10) und C_i-like (PSMB9) Proteasomenuntereinheiten in Bezug gesetzt. Die Expression der T_i- (p = 0,05) und C_i-like (p = 0,02) Proteasomenuntereinheiten korrelierte mit der intrazellulären Bortezomibakkumulation. Für alle anderen Proteasomenuntereinheiten konnte keine signifikante Korrelation ermittelt werden. Die Korrelationsanalyse erfolgte mit Hilfe der nicht-parametrischen Spearman-Korrelation.

3.6.3 Zusammenhang zwischen der inhibitorischen Potenz (IC₅₀) von Bortezomib an den CT- und T_i-like Untereinheiten mit der Expression dieser Proteasomenuntereinheiten in Zelllinien des Multiplen Myeloms

Für die untersuchten Ziellinien (EJM, Karpas-620, L363, LP-1, OPM-2) wurde die inhibitorische Potenz von Bortezomib an der entsprechenden Proteasomenuntereinheit mit der Expression der Proteasomenuntereinheit bzw. Immun-Proteasomenuntereinheiten korreliert. Bei der Bestimmung der Reduktion der katalytischen Aktivität der Untereinheiten durch Bortezomib konnte nicht zwischen der regulären und immunspezifischen Proteasomenuntereinheit unterschieden werden. Es konnte kein Zusammenhang festgestellt werden zwischen der Expression der CT-, C- und C_i-like Proteasomenuntereinheiten und der inhibitorischen Potenz von Bortezomib an den Untereinheiten. Im Gegensatz dazu korrelierte die Menge der CT_i-like Proteasomenuntereinheit signifikant (p = 0,02) mit der inhibitorischen Potenz (IC₅₀), d.h. eine hohe Expression dieser Untereinheit ging mit einer hohen IC₅₀ (geringe Potenz) der proteasomalen Hemmung durch Bortezomib einher (**Abbildung 36, Anhang 7.3.2, Abbildung A.11**).

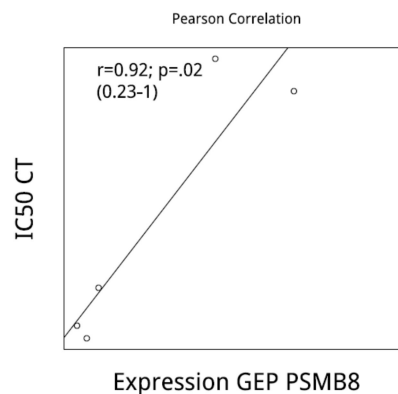
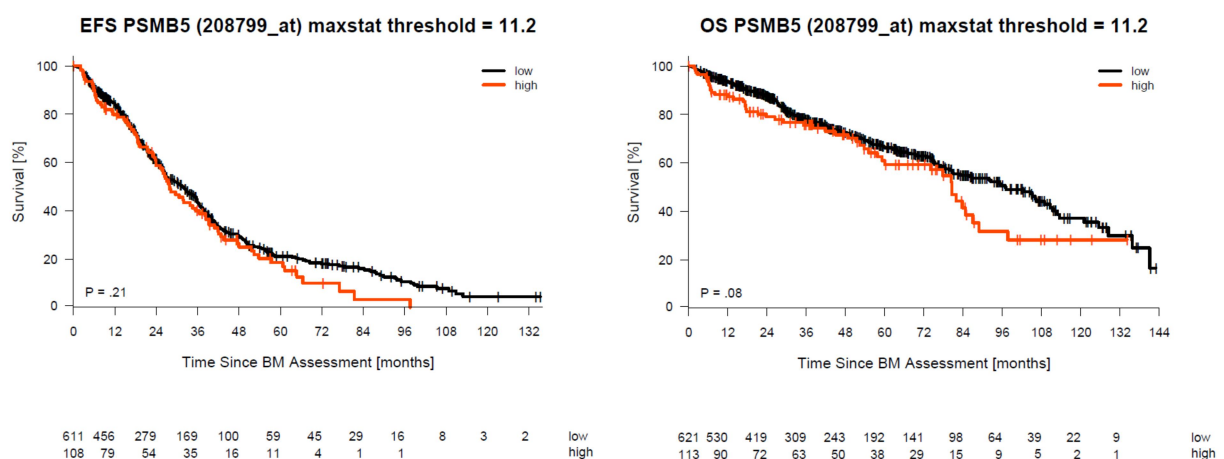


Abbildung 36: Korrelation der inhibitorischen Potenz (IC₅₀) an der CT_i-like Proteasomenuntereinheit mit deren Expressionsstärke in Zelllinien des Multiplen Myeloms. Zur Korrelationsanalyse wurde die IC₅₀ der Multiplen Myelomzelllinien (n = 5) nach 1 h Exposition mit 0,001-10,0 µM Bortezomib mit der durch *gene expression profiling* (GEP) vermittelten Expression CT_i-like (PSMB8) Proteasomenuntereinheiten in Bezug gesetzt. Die Expression korrelierte (p = 0,02) mit der IC₅₀ dieser Proteasomenuntereinheit. Für alle anderen Proteasomenuntereinheiten konnte keine signifikante Korrelation ermittelt werden. Die Korrelationsanalyse erfolgte mit Hilfe der nicht-parametrischen Spearman-Korrelation.

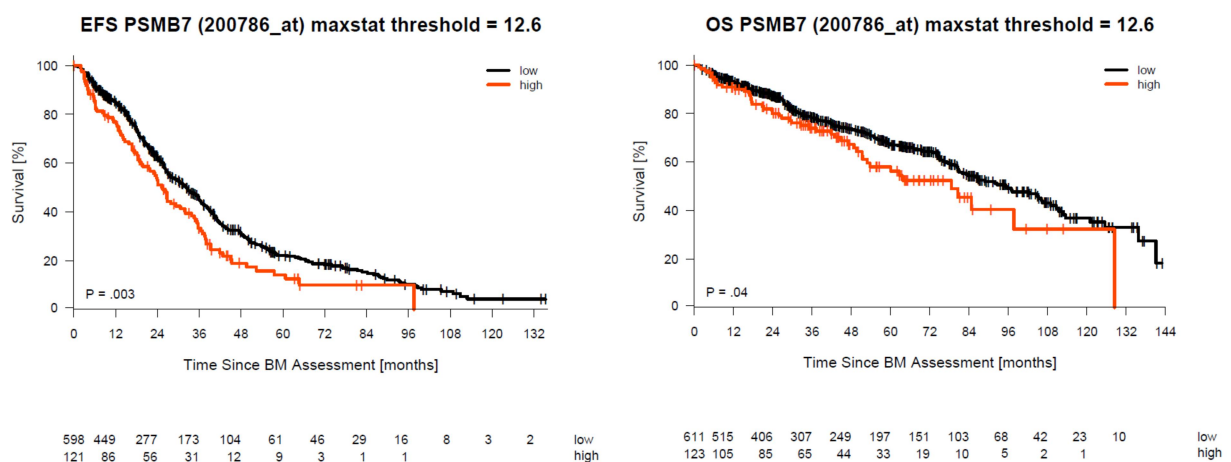
3.6.4 Zusammenhang zwischen der Expression der enzymatischen Proteasomenuntereinheiten mit dem ereignisfreien Überleben und Gesamtüberleben von Patienten mit Multiplem Myelom

In der untersuchten Kohorte war der Trend zu beobachten, dass eine niedrige Expression der CT-, T- und C-like Proteasomenuntereinheiten mit einer höheren Wahrscheinlichkeit für ein verlängertes ereignisfreies Überleben und Gesamtüberleben assoziiert war (**Abbildung 37**). Eine niedrige Expression der T-like Proteasomenuntereinheit korrelierte mit einem längeren ereignisfreien Überleben ($p = 0,003$) und eine niedrigere Expression der C- und T-like Untereinheit mit einem längeren Gesamtüberleben ($p = 0,04$ und $p = 0,02$). Auch für die Immun-Proteasomen-untereinheiten CT_I- und T_I-like wurde ein Zusammenhang in den Überlebenszeitanalysen für das Gesamtüberleben (CT_I-like $p = 0,02$ und C_I-like $p = 0,003$) gezeigt. (**Abbildung 38**). In der TT2/TT3 Validierungskohorte konnte dieser Trend allerdings nicht bestätigt werden (siehe **Anhang 7.3.3, Abbildung A.12**). Dort ging eine höhere Expression der CT-like Proteasomenuntereinheit signifikant mit einem besseren ereignisfreien Überleben ($p = 0,01$), bzw. eine höhere Expression der C_I-like-Proteasomenuntereinheit signifikant mit einem besseren Gesamtüberleben ($p = 0,03$) einher.

A



B



C

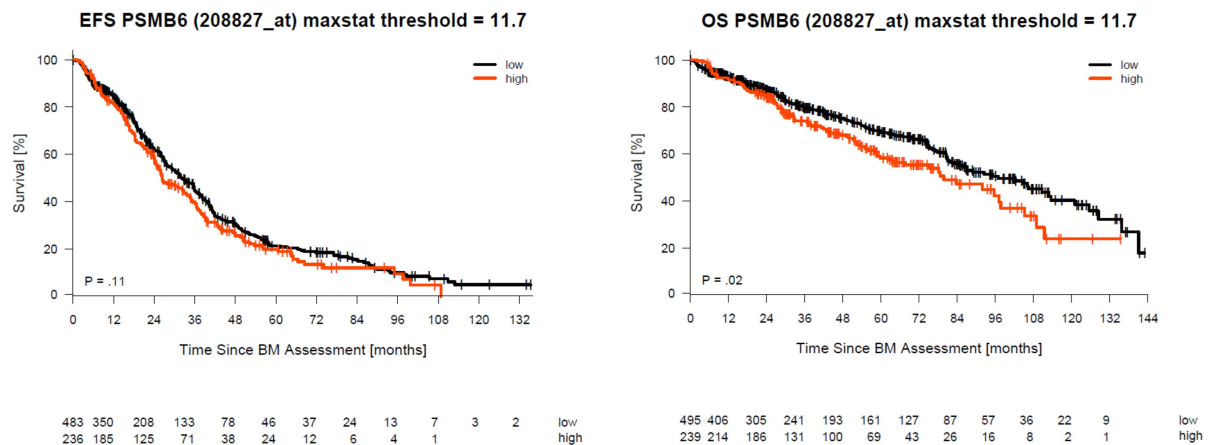
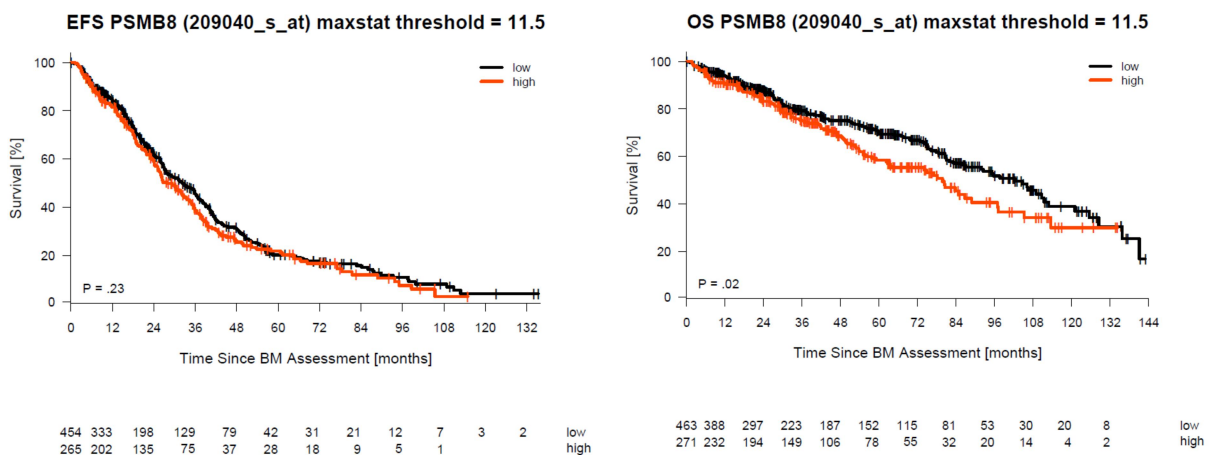
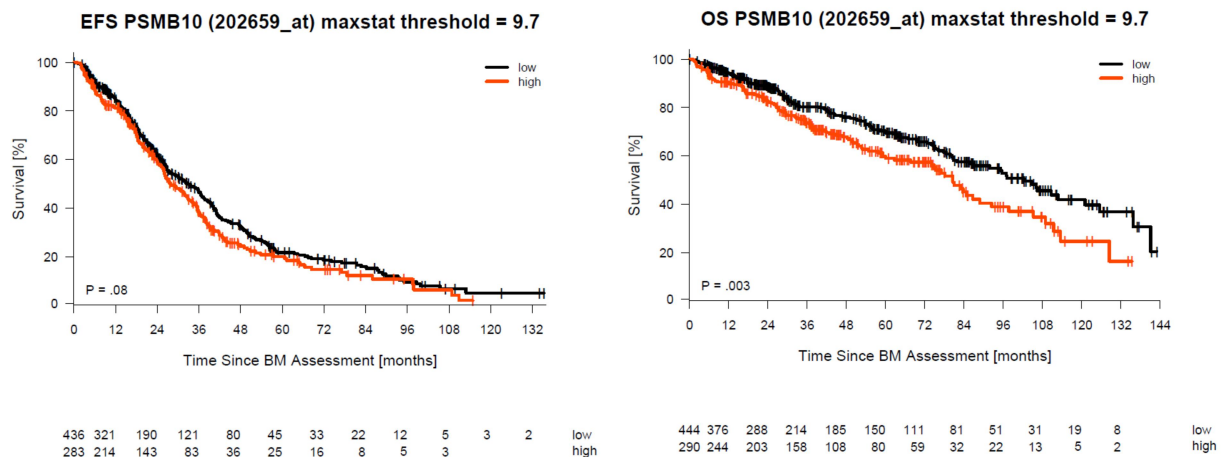


Abbildung 37: Zusammenhang zwischen der Expression der katalytisch aktiven, konstitutiven Proteasomenuntereinheiten und dem ereignisfreien Überleben (*event-free survival*, EFS) und Gesamtüberleben (*overall survival*; OS). Überlebenszeitanalyse durch Anwendung des Kaplan-Meier-Schätzers in einer Kohorte unbehandelter symptomatischer Patienten mit Multiplen Myelom, zur Vorhersage des ereignisfreien Überlebens (n = 719) und Gesamtüberlebens (n = 734) in Abhängigkeit von der niedrigen (schwarz) und hohen Expression (rot) der (A) CT- (PSMB5), (B) T- (PSMB7) und (C) C-like (PSMB6) Proteasomenuntereinheiten. Die Zuordnung der Expressionsstärke (niedrig/hoch) erfolgte mittels *maximally selected rank statistics* auf Basis des vorangegangenen *gene expression profiling*. Niedrige Expressionslevel der T-like Proteasomenuntereinheit korrelierten mit einem längeren ereignisfreien Überleben (p = 0,003) und eine niedrigere Expression der C- und T-like Untereinheiten mit einer längeren Gesamtüberleben (p = 0,04 und p = 0,02). Für die CT-like Proteasomenuntereinheit konnte keine Korrelation mit dem ereignisfreien Überleben oder Gesamtüberleben ermittelt werden.

A



B



C

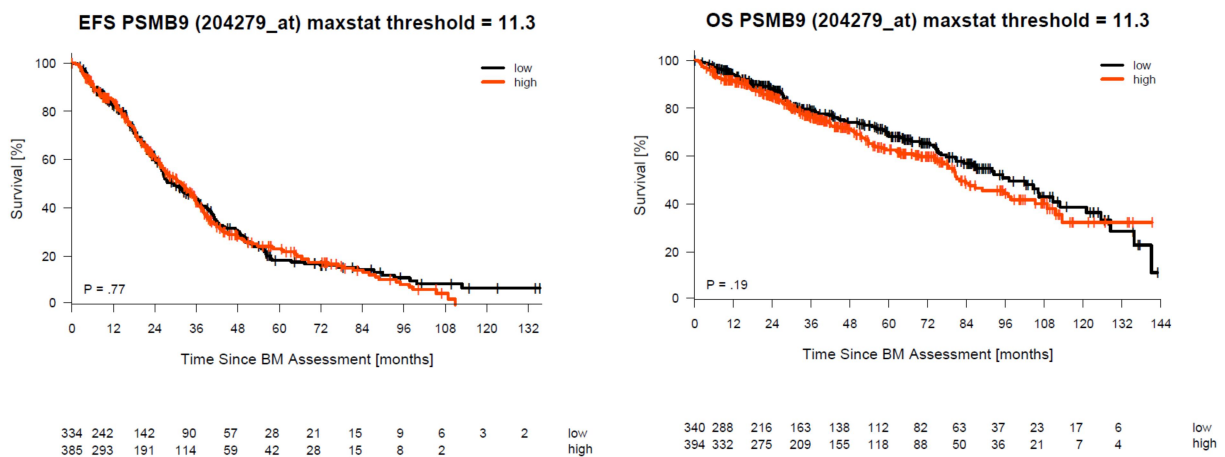


Abbildung 38: Zusammenhang zwischen der Expression der katalytisch aktiven Immun-Proteasomenuntereinheiten und dem ereignisfreien Überleben (*event-free survival*, EFS) und Gesamtüberleben (*overall survival*, OS). Überlebenszeitanalyse durch Anwendung des Kaplan-Meier-Schätzers einer Kohorte symptomatischer Patienten mit Multiplen Myelom zur Vorhersage des ereignisfreien Überlebens ($n = 719$) und Gesamtüberlebens ($n = 734$) in Abhängigkeit von der niedrigen (schwarz) und hohen Expression (rot) der (A) CT_{i-} (PSMB8), (B) T_{i-} (PSMB10) und (C) C_{i-like} (PSMB9) Proteasomenuntereinheiten. Die Zuordnung der Expressionsstärke (niedrig/hoch) erfolgte mittels *maximally selected rank statistics* auf Basis des vorangegangenen *gene expression profiling*. Für die CT_{i-} und T_{i-like} Proteasomenuntereinheiten wurde ein signifikanter Zusammenhang für das Gesamtüberleben (CT_{i-like} $p = 0,02$ und T_{i-like} $p = 0,003$) bestätigt.

3.7 Einfluss der Kombinationstherapieregime PAD und VMP auf die intrazelluläre Bortezomibakkumulation, Zellviabilität und Inhibition der Proteasomenuntereinheiten

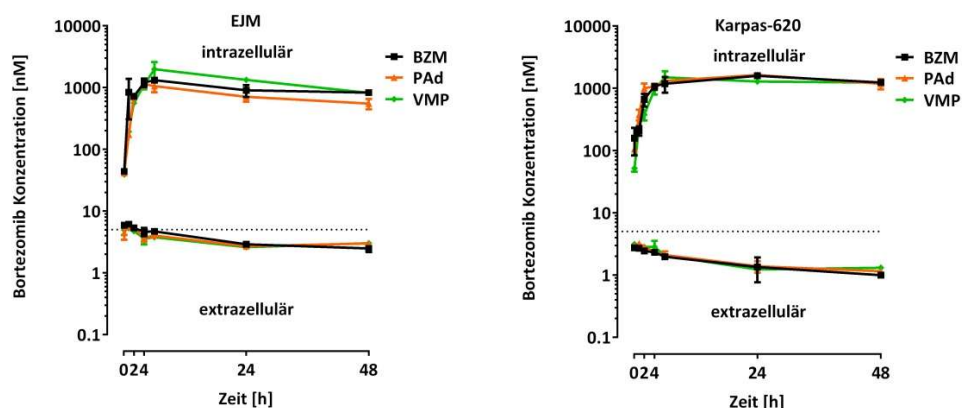
Bortezomib wird in der Induktionstherapie zur Behandlung des Multiplen Myeloms neu diagnostizierter Patienten immer in Kombination mit anderen Wirkstoffen eingesetzt. Die zellulären, mechanistischen Grundlagen der *in vivo* nachgewiesenen, überlegenen Wirksamkeit der Kombinationstherapieregime im Vergleich zur Behandlung mit Bortezomib als Einzelsubstanz wurden bisher nicht abschließend geklärt. Unklar ist, ob dies auf die unterschiedlichen zur Apoptose

führenden Wirkmechanismen der Einzelsubstanzen oder zusätzlich auf eine synergistische Pharmakodynamik an einem gemeinsamen *target* bzw. Signalweg zurückzuführen ist.

Zur Klärung dieser offenen Fragen wurde untersucht, ob die intrazelluläre Bortezomibakkumulation und damit die zelluläre Pharmakokinetik in Kombinationstherapie-regimen im Vergleich zur alleinigen Exposition mit Bortezomib variieren. Für die *in vitro* Experimente wurden hierbei das PAd Induktionstherapieregime für ASCT-fähige Patienten sowie VMP als Wirkstoffkombination der Induktionstherapie für nicht Transplantations-fähige Patienten simuliert. Auch die Veränderungen pharmakodynamischer Prozesse wurden evaluiert. Hierzu wurde zum einen die inhibitorische Potenz von Bortezomib an der wirksamkeitsbestimmenden CT-like Proteasomenuntereinheit, zum anderen dessen Einfluss auf die Viabilität der Myelomzellen innerhalb der Wirkstoffkombinationen bestimmt und in Bezug zur Einzelexposition gesetzt. Gleichzeitig wurde auch geprüft, ob die verwendeten Konzentrationen der Wirkstoffe Doxorubicin, Dexamethason, Melphalan und Prednisolon allein einen Effekt auf die Viabilität von Myelomzellen bzw. die Aktivität der drei Proteasomenuntereinheiten haben.

3.7.1 Intra- und extrazelluläre Bortezomibkonzentration in Zelllinien des Multiplen Myeloms innerhalb der Kombinationstherapieregime PAd und VMP

Es wurde eine von der Expositionszeit abhängige, exponentielle Anreicherung von Bortezomib in den untersuchten Zelllinien ($n = 9$) nach Inkubation mit alleinigem Bortezomib, sowie innerhalb der beiden Kombinationstherapieregime beobachtet (**Abbildung 39**). Die intrazelluläre C_{max} variierte von 933 nM (LP-1, 24 h) bis 2165 nM (RPMI-8226, 24 h). Die Bortezomibkonzentration im korrespondierenden extrazellulären Medium nahm entsprechend zeitabhängig ab. Die intra- und extrazellulären Konzentrationen von Bortezomib unterschieden sich weder zwischen den beiden Wirkstoffkombinationen PAd und VMP, noch zu derer nach Exposition mit alleinigem Bortezomib.



Ergebnisse

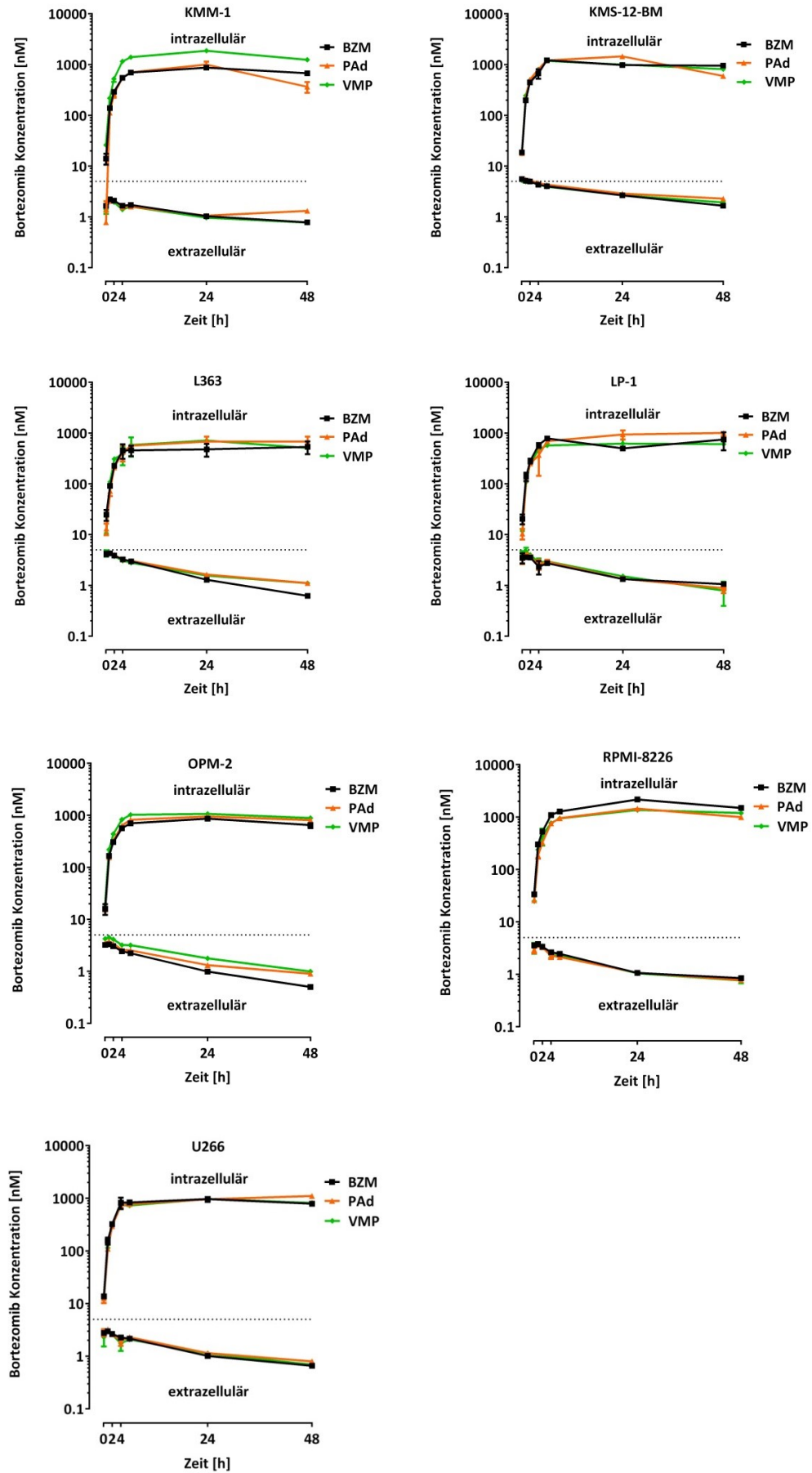


Abbildung 39: Intra- und extrazelluläre Bortezomibkonzentration [nM] in Myelomzelllinien und korrespondierenden Zellkulturüberständen nach 10 min, 1 h, 2 h, 4 h, 6 h, 24 h und 48 h Exposition gegenüber 5 nM Bortezomib allein, in Kombination mit 200 nM Doxorubicin und 300 nM Dexamethason (PAd) oder 600 nM Melphalan und 3,1 µM Prednisolon (VMP). Gezeigt sind die Mittelwerte \pm Standardabweichung für $n = 3$ Messwerte der intra- und extrazellulären Bortezomibkonzentration nach Exposition Myelomzellen ($n = 9$) mit 5 nM Bortezomib allein (schwarz) oder innerhalb der Kombinationstherapieregime PAd (grün) oder VMP (orange). Die zugegebene Bortezomibkonzentration von 5 nM wird durch eine gestrichelte Linie dargestellt. Die Zellen reichert Bortezomib Expositionszeit-abhängig, unabhängig davon ob dies als Einzelsubstanz oder in Kombination mit den anderen Wirkstoffen exponiert wurde, stark intrazellulär an. Die Messwerte hatte nur geringe interindividuelle Streuung zwischen den Zelllinien ($C_{\max} = 933\text{-}2165$ nM).

Die Integration der intra- und extrazellulären Verläufe der Bortezomibkonzentration über einen Zeitraum von 48 h ($AUC_{0-48\text{ h}}$) zeigte keine signifikanten Unterschiede für Bortezomib allein oder innerhalb der Kombinationstherapieregime PAd und VMP (**Abbildung 40**). Die mediane intrazelluläre Konzentration für die alleinige Exposition mit Bortezomib lag bei 44061 ± 16691 nM, innerhalb des Kombinationstherapieregimes PAd bei 43702 ± 10863 und mit der VMP-Kombination bei 48084 ± 14140 nM. Auch die extrazellulären Konzentrationen unterschieden sich im Median nur geringfügig für die ausschließliche Inkubation mit Bortezomib (88 nM ± 35 nM) oder in der Wirkstoffkombination PAd (94 ± 34 nM) und VMP (93 ± 31 nM). Zusammenfassend hat die Kombination von Bortezomib mit anderen antineoplastisch wirksamen Wirkstoffen innerhalb der PAd oder VMP Therapieregime keinen Einfluss auf die intrazelluläre Bortezomibakkumulation bzw. die zelluläre Bortezomib-Kinetik.

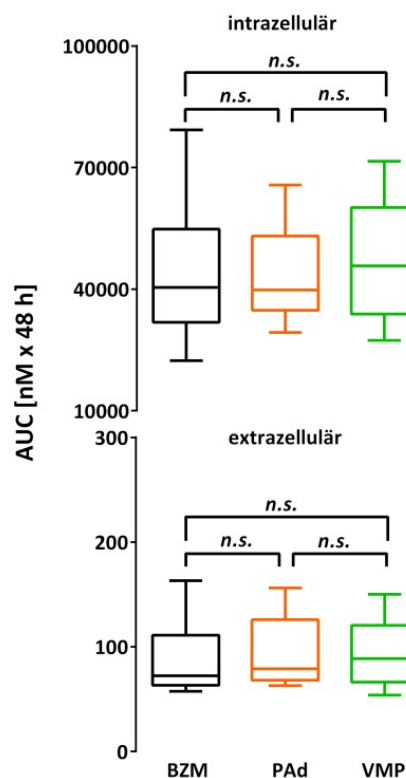


Abbildung 40: Area under the curve (AUC) [nM x 48 h] der intra- und extrazellulären Bortezomibkonzentration von Myelomzelllinien über einen Expositionszeitraum von 48 h mit 5 nM Bortezomib allein, in Kombination mit 200 nM Doxorubicin und 300 nM Dexamethason (PAd) oder 600 nM Melphalan und 3,1 µM Prednisolon (VMP). Dargestellt sind die medianen AUCs der intra- und extrazellulären Bortezomibkonzentrationen und deren Minima und Maxima. Die AUCs wurden berechnet aus der

Bortezomibquantifizierung in Zellpellets von Myelomzelllinien ($n = 9$) und korrespondierendem Zellkulturmedium. Die intra- und extrazellulären AUCs zeigte keine signifikanten Unterschiede für Bortezomib allein oder innerhalb der Kombinationstherapieregime PAd und VMP. Die statistische Analyse wurde mittels Kruskal-Wallis Test mit *post hoc* Dunn's multiple comparison Test durchgeführt.

3.7.2 Einfluss von Bortezomib auf die Zellviabilität verschiedener Zelllinien des Multiplen Myeloms innerhalb der Kombinationstherapieregime PAd und VMP nach 24 h Expositionszeit

Zuerst wurde geprüft, ob die verwendeten Konzentrationen von Doxorubicin, Dexamethason, sowie Melphalan und Prednisolon einen antiproliferativen Effekt ohne Kombination mit Bortezomib auf die Zellen haben. Es konnte kein Einfluss der Einzelsubstanzen auf die Zellviabilität in den innerhalb der experimentellen Kombinationstherapieregime verwendeten Konzentrationen festgestellt werden (**Abbildung 41**).

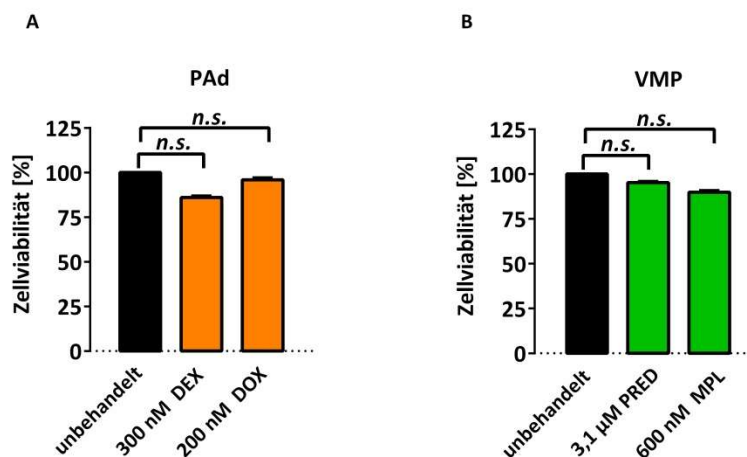


Abbildung 41: Einfluss von 300 nM Dexamethason, 200 nM Doxorubicin, 3,1 µM Prednisolon und 600 nM Melphalan auf die Zellviabilität [%] von Myelomzelllinien nach 24 h Expositionszeit. Dargestellt sind die Mittelwerte aller untersuchten Multiplen Myelomzelllinien ($n = 7$) \pm Standardabweichung für $n = 224$ Messwerten (Mittelwert der 7 Zelllinien mit je 4 biologischen Replikaten und 8 technischen Replikaten). Die zur *in vitro* Simulation der Kombinationstherapieregime (A) PAd und (B) VMP verwendeten Konzentrationen von Dexamethason, Doxorubicin, Prednisolon zeigten keine signifikanten Effekte auf die Zellviabilität der Multiplen Myelomzelllinien nach 24 h Exposition.

Die antiproliferative Potenz von Bortezomib (IC_{50}) nach 24-stündiger Exposition mit Bortezomib allein oder innerhalb der Kombinationstherapieregime PAd oder VMP unterschied sich in den meisten der getesteten Zelllinien nicht (**Abbildung 42**). Lediglich in den Zelllinien Karpas-620 ($p = 0,033$) und KMM-1 ($p = 0,013$) wurde die Potenz während Inkubation mit der Wirkstoffkombination PAd in Vergleich zu Bortezomib signifikant verringert (höhere IC_{50}). Für die Exposition mit Bortezomib innerhalb des VMP Therapieregimes wurde keine Veränderung der Potenz im Vergleich zu alleinigem Bortezomib beobachtet. Beim direkten Vergleich der Wirkstoffkombinationen PAd und VMP war Bortezomib innerhalb von PAd in den Zelllinien L-363 ($p = 0,032$) und LP-1 ($p = 0,005$) potenter (Konzentrations-Wirkungskurven siehe **Anhang 7.4.1, Abbildung A.14**).

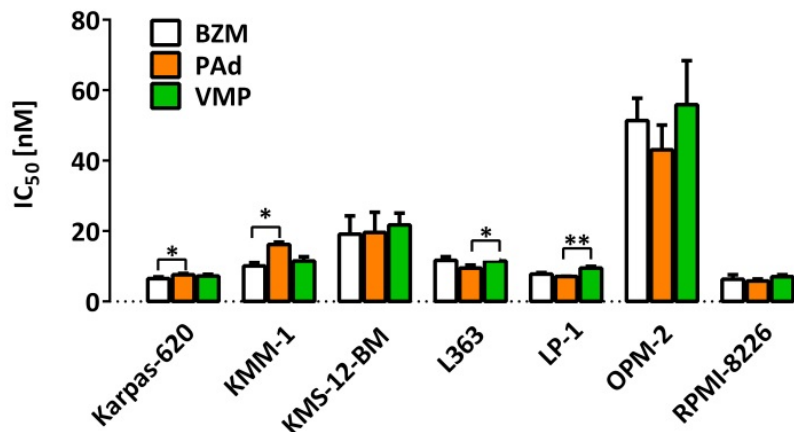


Abbildung 42: Vergleich der inhibitorischen Potenz (IC_{50}) von 0,001-10 μ M Bortezomib allein, in Kombination mit 200 nM Doxorubicin und 300 nM Dexamethason (PAd) oder 600 nM Melphalan und 3,1 μ M Prednisolon (VMP) in Bezug auf die Zellviabilität von Myelomzelllinien nach 24 h Expositionszeit. Dargestellt sind die Mittelwerte der IC_{50} jeder Multiplen Myelomzelllinie ($n = 7$) \pm Standardabweichung für $n = 4$ biologische Replikate nach Exposition mit 0,001-10,0 μ M Bortezomib allein bzw. PAd (orange) und VMP (grün). In den Zelllinien Karpas-620 ($p = 0,033$) und KMM-1 ($p = 0,013$) wurde die IC_{50} durch Exposition mit PAd in Vergleich zu Bortezomib allein signifikant erhöht. Für die Exposition mit Bortezomib innerhalb des VMP-Therapieregimes wurde keine Veränderung der IC_{50} im Vergleich zu alleinigem Bortezomib beobachtet. Beim direkten Vergleich der Wirkstoffkombinationen PAd und VMP war Bortezomib innerhalb von PAd in den Zelllinien L-363 ($p = 0,032$) und LP-1 ($p = 0,005$) potenter. Die statistische Analyse wurde mittels Kruskal-Wallis Test mit post hoc Dunn's multiple comparison Test durchgeführt.

Die Zelllinien EJM und U266 waren nicht ausreichend sensitiv gegenüber Bortezomib (**Abbildung 43**). Damit war keine Berechnung der IC_{50} möglich. Die Viabilität der Zellen wurde nach Exposition mit 20 μ M Bortezomib maximal um 55 % (U266) bzw. 65 % (EJM) reduziert. Dennoch war in der Zelllinie EJM eine Linksverschiebung der Konzentrations-Wirkungskurve für das Kombinationstherapieregime PAd im Vergleich zu Bortezomib allein zu beobachten. Dies deutet auf eine potentere Wirksamkeit (ggf. niedrigere IC_{50}) von Bortezomib innerhalb der Wirkstoffkombination PAd hin.

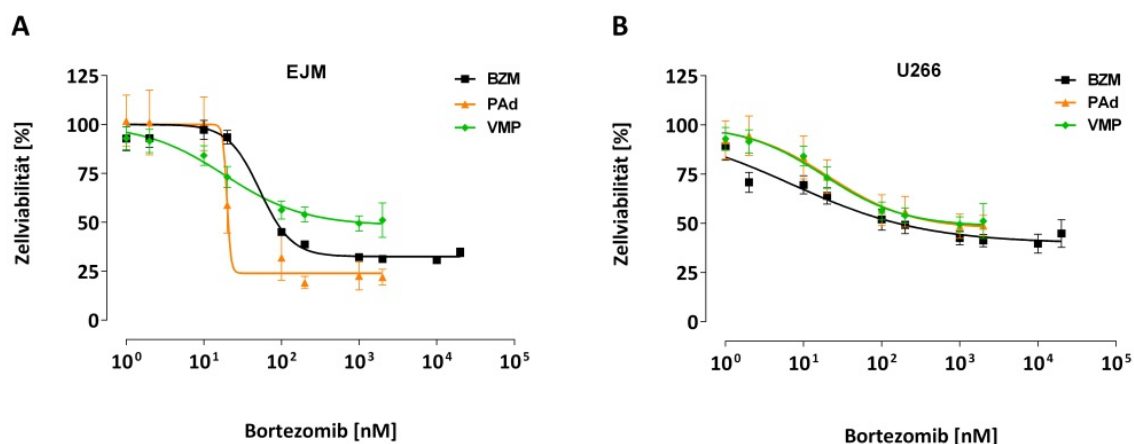


Abbildung 43: Zelllinien, die nach 24 h Exposition mit 0,001-10 μ M Bortezomib allein, in Kombination 200 nM Doxorubicin und 300 nM Dexamethason (PAd) oder 600 nM Melphalan und 3,1 μ M Prednisolon (VMP) nicht potent in ihrer Zellviabilität [%] reduziert wurden. Zu sehen sind die Mittelwerte \pm Standardabweichung für $n = 32$ Messwerte (4 biologische Replikate und 8 technische Replikate) nach Exposition mit 0,001-10 μ M Bortezomib allein bzw. innerhalb der Kombinationstherapieregime PAd (orange) und VMP (grün). Die Zelllinien

(A) EJM und (B) U266 wurden nach Exposition mit Bortezomib bzw. PAD und VMP nicht mehr als 65 % in ihrer Viabilität reduziert. Für die Zelllinie EJM ist eine mögliche potentere Wirkung von PAD durch Linksverschiebung der Konzentrations-Wirkungskurve im Vergleich zu Bortezomib allein zu vermuten.

3.7.3 Bestimmung der inhibitorischen Potenz von Bortezomib, Doxorubicin, Dexamethason, Prednisolon, Melphalan sowie von Bortezomib innerhalb der Kombinations-therapieregime PAD und VMP an den Proteasomenuntereinheiten

Die Peptidspaltungsaktivität der CT-, T- und C-like Proteasomenuntereinheit wurde nach 1-stündiger Exposition mit variierenden Konzentrationen von Dexamethason, Doxorubicin, Prednisolon oder Melphalan in allen getesteten Zelllinien nicht signifikant beeinflusst. Für Doxorubicin war eine Hemmung der drei Proteasomenuntereinheiten um ca. 10 % bzw. 20 % in den Konzentrationen 10 und 50 μM zu sehen. Diese Konzentrationen liegen allerdings weit über der in dem experimentellen Kombinationstherapieregime PAD verwendeten Konzentration von 200 nM (in **Abbildung 44** exemplarisch für die Zelllinie RPMI-8266 gezeigt).

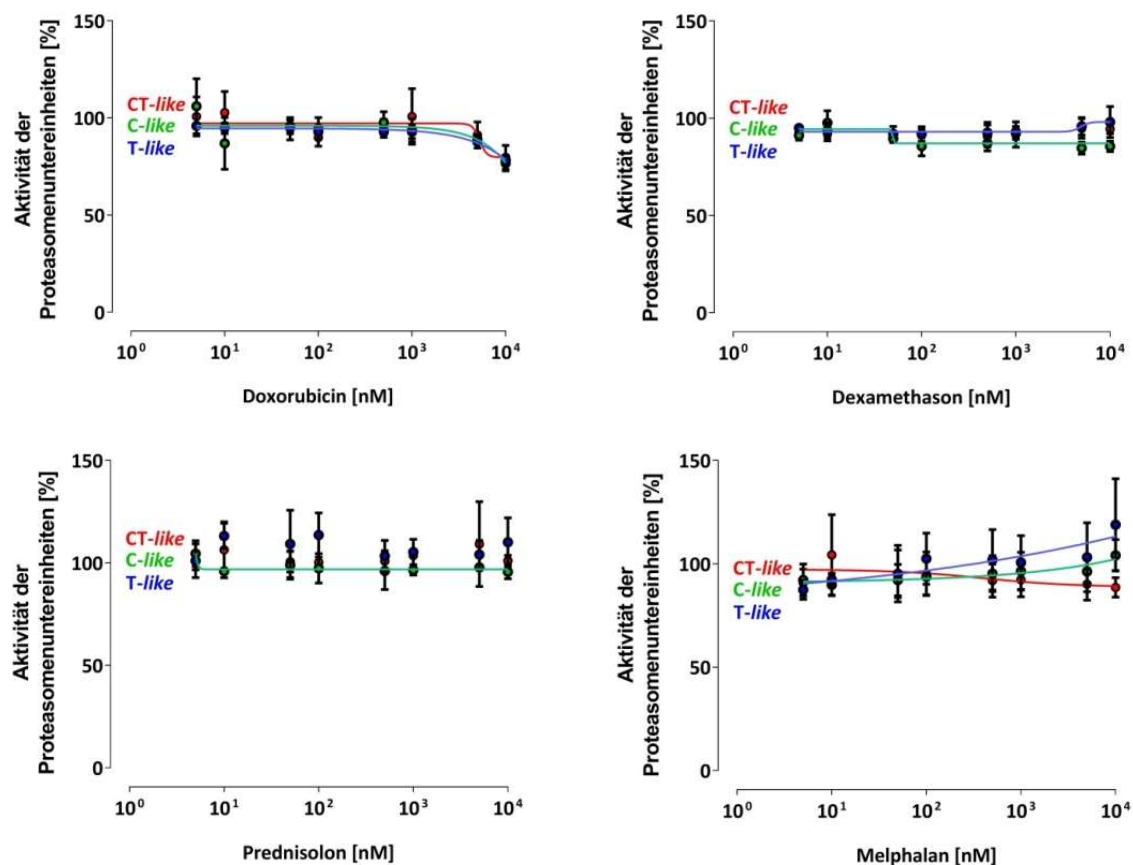


Abbildung 44: Exemplarische Darstellung zur Bestimmung der Konzentrations-abhängigen inhibitorischen Wirksamkeit von Doxorubicin, Dexamethason, Prednisolon und Melphalan auf die katalytische Aktivität Proteasomenuntereinheiten [%] der Myelomzelllinie RPMI-8226. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm Standardabweichung für $n = 3$ Messwerte (technische Replikate) nach Exposition mit 0,05-10 μM Doxorubicin, Dexamethason, Prednisolon und Melphalan für die Multiple Myelomzelllinie RPMI-8226. Für hohe Konzentrationen von Doxorubicin (10 und 50 μM) war eine maximal 20 %-ige Reduktion der Aktivität der CT-, T- und C-like Proteasomenuntereinheiten zu beobachten. Für die aufsteigenden Konzentrationen von

Dexamethason, Prednisolon und Melphalan wurde keine Beeinflussung der proteasomalen Peptidspaltungsaktivität nachgewiesen.

Im Vergleich zur alleinigen Anwendung zeigte Bortezomib innerhalb der Wirkstoffkombination VMP in den Zelllinien LP-1 ($p = 0,022$) und RPMI-8226 ($p = 0,022$) eine höhere inhibitorische Potenz an der CT-like Untereinheit (siehe **Abbildung 45**). Ein signifikant niedrigerer IC_{50} -Wert und damit eine erhöhte inhibitorische Potenz von Bortezomib innerhalb des PAd Regimes wurde in der KMM-1 Zelllinie ($p = 0,034$) nachgewiesen.

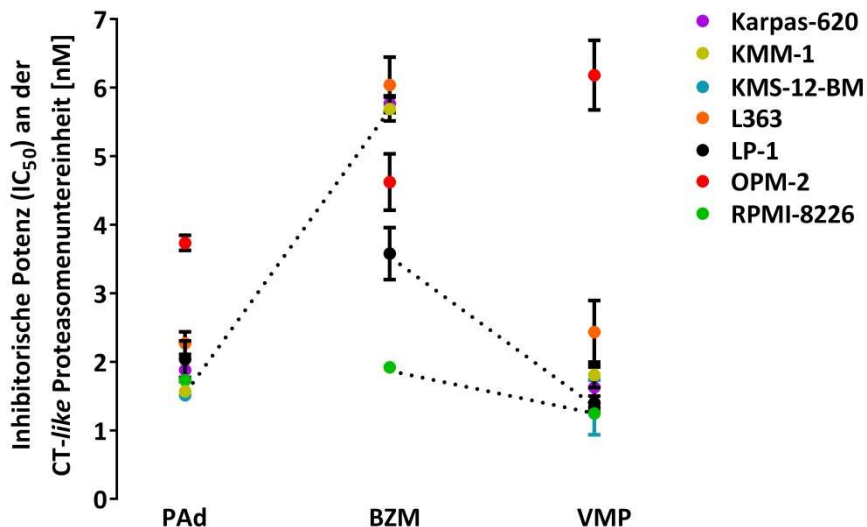


Abbildung 45: Vergleich der inhibitorischen Potenz (IC_{50}) von 5 nM Bortezomib allein, in Kombination mit 200 nM Doxorubicin und 300 nM Dexamethason (PAd) oder 600 nM Melphalan und 3,1 μ M Prednisolon (VMP) an der CT-like Proteasomenuntereinheit von Myelomzelllinien. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm Standardabweichung (SD) der IC_{50} bezogen auf die Aktivität der CT-like Proteasomenuntereinheit der Multiplen Myelomzelllinien ($n = 7$) für $n = 3$ biologische Replikate nach Exposition mit 0,001-10 μ M Bortezomib bzw. PAd und VMP. Für Bortezomib innerhalb der Wirkstoffkombination VMP wurde im Vergleich zur Exposition mit Bortezomib allein in den Zelllinien LP-1 ($p = 0,022$) und RPMI-8226 ($p = 0,022$) eine signifikant stärkere Hemmung der Aktivität der CT-like Proteasomenuntereinheit nachgewiesen. Ebenso konnte eine potentere inhibitorische Wirksamkeit von Bortezomib innerhalb des PAd-Kombinationstherapie regimes im Vergleich zu Bortezomib allein in der Zelllinie KMM-1 ($p = 0,034$) gezeigt werden. Die statistische Analyse wurde mittels Kruskal-Wallis Test mit *post hoc* Dunn's multiple comparison Test durchgeführt.

3.7.4 Einfluss der Expositionsdauer von 5 nM Bortezomib allein oder innerhalb der Kombinationstherapie regime PAd und VMP auf die Aktivität der Proteasomenuntereinheiten

Unabhängig von der Expositionszeit wurde die CT-like Proteasomenuntereinheit am effektivsten inhibiert. Allerdings zeigten sich stark variierende Sensitivitäten zwischen den Zelllinien, sowohl bei Behandlung mit alleinigem Bortezomib als auch in Kombination mit anderen Wirkstoffen (siehe **Abbildung 46**, sowie **Anhang 7.4.2**, **Abbildung A.15**, **A.16** und **A.17**), wobei keinerlei signifikante Unterschiede zwischen den Therapie regimen festzustellen waren.

Die Aktivität der T-like Proteasomenuntereinheit zeigte unter allen experimentellen Bedingungen (Bortezomib allein/innerhalb von PAd oder VMP) erneut die für Bortezomib charakteristische kompensatorische Steigerung (mit Ausnahme der Zelllinie EJM, Karpas-620 und RPMI-8226). Für die

C-like Untereinheit konnte kein Trend bzw. signifikante Unterschiede festgestellt werden, da die gemessenen Werte innerhalb der Zelllinien und der jeweiligen Behandlungen erheblich schwankten. Die Inhibition der CT-, T- und C-like Proteasomenuntereinheiten innerhalb der Kombinationstherapieregime PAd und VMP wurde im Vergleich zu Bortezomib zu keinem Zeitpunkt signifikant verändert.

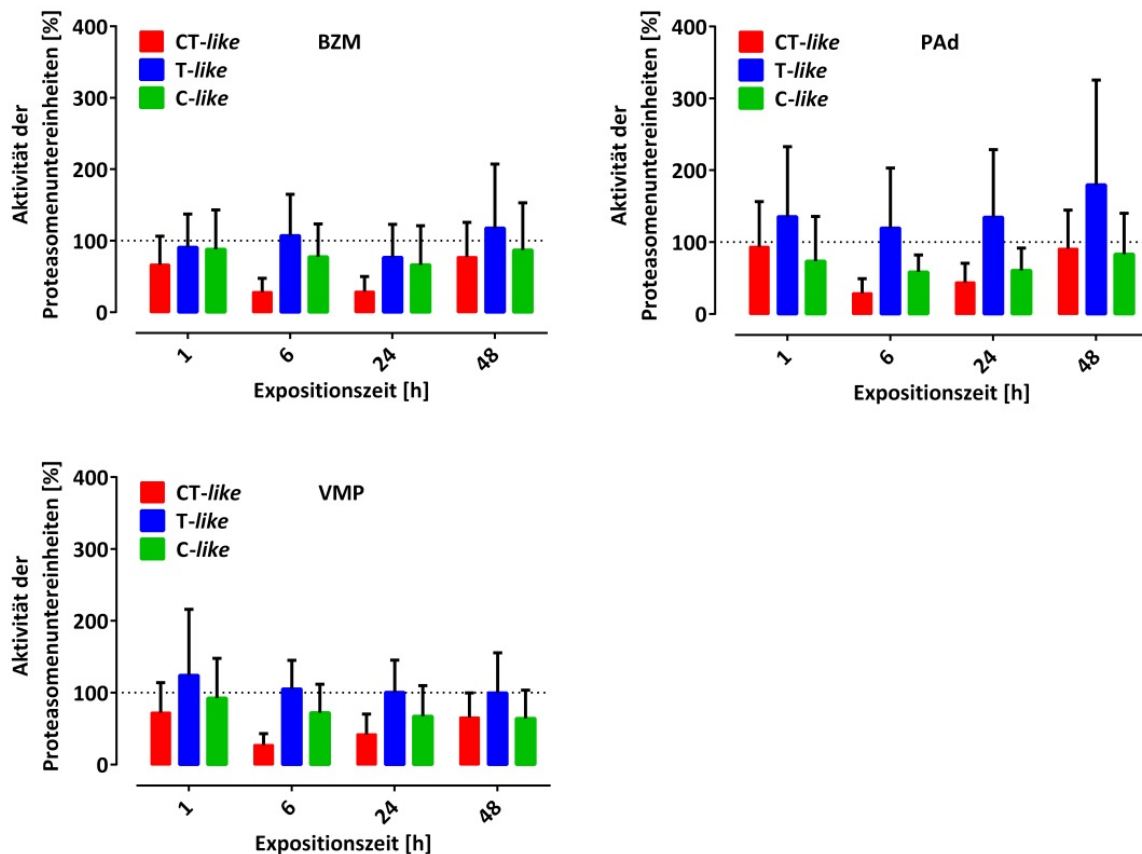


Abbildung 46: Expositionszeit-abhängige Inhibition der katalytischen Aktivität der Proteasomenuntereinheiten [%] in Myelomzelllinien durch 5 nM Bortezomib allein, in Kombination 200 nM Doxorubicin und 300 nM Dexamethason (PAd) oder 600 nM Melphalan und 3,1 µM Prednisolon (VMP). Dargestellt sind die Mittelwerte ± Standardabweichung der untersuchten Multiplen Myelomzelllinien (n = 7) der Aktivität der CT-, T- und C-like Proteasomenuntereinheiten [%] nach 1 h, 6 h, 24 h und 48 h Exposition mit 5 nM Bortezomib allein oder innerhalb der Wirkstoffkombinationen PAd und VMP. Die CT-like Proteasomenaktivität wurde durch Bortezomib allein bzw. innerhalb der Kombinationstherapieregime PAd und VMP am effektivsten inhibiert. Eine kompensatorische Gegenregulation der T-like Proteasomenuntereinheit wurde ebenfalls beobachtet (100 % Aktivität der Proteasomenuntereinheiten = gestrichelte Linie). Die gezeigten Ergebnisse wiesen starke interindividuelle Schwankungen auf. Die Hemmung der Proteasomenuntereinheiten innerhalb der Kombinationstherapieregime PAd und VMP wurde im Vergleich zu Bortezomib zu keinem Zeitpunkt signifikant verändert. Die statistische Analyse wurde mittels Kruskal-Wallis Test mit *post hoc* Dunn's multiple comparison Test durchgeführt.

3.8 Einfluss von Bosentan in Kombination mit Bortezomib auf die intrazelluläre Bortezomibkonzentration, Viabilität und Inhibition der Proteasomenuntereinheiten in Zelllinien des Multiplen Myeloms

Neben den etablierten Wirkstoffkombinationen sind auch Kombinationen von Bortezomib mit anderen ggf. synergistisch wirksamen Substanzen Bestandteil aktueller Forschung. *In vitro* Daten zeigten eine proliferationsfördernde Wirkung von Endothelin, sodass die Blockade entsprechender Rezeptoren (ET_A- und ET_B-Rezeptor) mittels Bosentan (einem dualen Antagonisten beider Rezeptorsubtypen) eine therapeutische Option darstellen könnte (Vaiou et al., 2016). Vereinzelt experimentelle Studien zeigten tatsächlich eine antiproliferative Wirkung von Bosentan auf Zelllinien eines Multiplen Myeloms (Russignan et al., 2017).

Zur detaillierten Überprüfung dieser Hypothese unsererseits sollte zunächst sichergestellt werden, dass der ET-1-Signalweg wie in anderen malignen Zellen auch in unseren Zellmodellen des Multiplen Myeloms vorhanden und aktiv ist (Irani et al., 2014b; Rosano et al., 2013). Hierzu wurde die Expression von ET-1, ET_A- und ET_B-Rezeptoren in den 9 Myelomzelllinien, sowie Plasmazellen gesunder Spender, malignen Plasmazellen und weiteren Myelomzelllinien bestimmt. Ebenfalls wurde geprüft, ob die zelluläre Bortezomib-Kinetik durch Bosentan (z.B. durch Interaktion an dem Arzneistofftransporter *organic anion transporting polypeptide 1B3* (OATP1B3)) verändert wird. Um die bereits publizierte antiproliferative Wirksamkeit einer Endothelinrezeptor-Antagonisierung in den Myelomzelllinien zu bestätigen, wurden diese zunächst alleinig mit den selektiven Antagonisten BQ123 bzw. BQ788 oder dem unselektiven Antagonisten Bosentan exponiert und der Konzentrations-Wirkungs-Zusammenhang bestimmt (Russignan et al., 2017; Vaiou et al., 2016). Im Anschluss wurde experimentell die kombinatorische Wirkung von Bortezomib und BQ123, BQ788, Bosentan oder ET-1 bestimmt. Um eine konzentrationsabhängige Selektivität von BQ123 und BQ788 zu berücksichtigen, wurden die Zellen nicht nur mit der in der Literatur häufig verwendeten, aber unselektiven Konzentration von 10 µM, sondern auch mit einer niedrigen Konzentration von 0,1 µM innerhalb der Wirkstoffkombination exponiert (Russignan et al., 2017). Um zu klären, ob eine verstärkte antiproliferative Wirksamkeit von Bortezomib in Kombination mit Bosentan auf einen inhibitorischen Effekt von Bosentan an den katalytischen Funktionseinheiten des Proteasoms zurückzuführen ist, wurde die Aktivität der Proteasomenuntereinheiten nach Exposition mit alleinigem Bortezomib sowie in Kombination mit Bosentan bestimmt. Abschließend wurde geprüft, ob der antiproliferative Effekt von Bortezomib plus Bosentan auf die akute Zytotoxizität der verwendeten Konzentrationen zurückzuführen ist.

3.8.1 Expression und Freisetzung von ET-1

Die basale mRNA von ET-1 war in allen Zelllinien nachweisbar, wobei EJM die höchste Expression aufwies und KMS-12-BM die niedrigste (**Abbildung 47 (A)**). Zur Untermauerung der mRNA Daten sollte die ET-1 Proteinmenge in den Kulturüberständen der korrespondierenden Zelllinien mittels ET-1 ELISA bestimmt werden. Der ELISA erwies sich jedoch als zu unsensitiv, um eine verlässliche ET-1 Quantifizierung zu ermöglichen. Für die Zelllinien EJM, Karpas-620, KMM-1, RPMI-8226 und U266 konnten zwar im Überstand Endothelinkonzentrationen im fM Bereich quantifiziert werden, allerdings lagen die der Zelllinien KMS-12-BM, L363, LP-1 und OPM-2 unterhalb des Detektionslimits (**Abbildung 47 (B)**). Trotz Überarbeitung des Protokolls durch eine Steigerung der eingesetzten

Ergebnisse

Zellmenge von 1×10^6 Zellen (in 3,00 ml korrespondierendem Medium) auf 2×10^6 Zellen (in 1,50 ml Medium), waren die quantifizierte ET-1 Mengen bei den verbleibenden Zelllinien zu gering, um Aussagen über die Proteinmenge nach 24 h zu treffen.

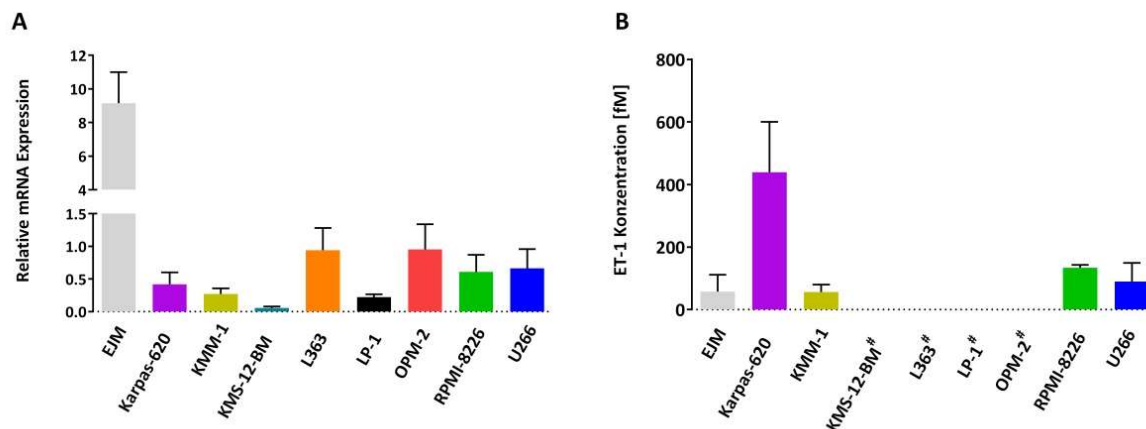


Abbildung 47: Bestimmung der Expression von Endothelin 1 (ET-1) auf mRNA und Proteinebene in Zelllinien des Multiplen Myeloms. (A) Bestimmung der relativen ET-1 mRNA Expression in unbehandelten Multiplen Myelom-zelllinien (n = 9) mittels *quantitative polymerase chain reaction*. In allen Zelllinien wurde die mRNA von ET-1 in unterschiedlicher Stärke exprimiert. In der Zelllinien EJM wurde ET-1 am stärksten exprimiert. (B) Bestimmung der ET-1 Proteinmenge [fM] in Kulturüberständen von 1×10^6 Zellen von n = 9 Myelomzelllinien nach 24 h mittels *enzyme-linked immunosorbent assay*. In den Zelllinien EJM, Karpas-620, KMM-1, RPMI-8226 und U266 konnten ET-1 Konzentrationen fM Bereich quantifiziert werden. Für die mit „#“ gekennzeichneten Zelllinien lag die ET-1 Proteinmenge unter dem Detektionslimit.

Neben der Expression in Multiplen Myelomzellen konnte mittels GEP gezeigt werden, dass Endothelin in allen malignen Plasmazellen exprimiert wird (siehe **Abbildung 48**). Neben diesen exprimieren auch andere Zelllinien des Multiplen Myeloms (n = 54), sowie nicht maligne Zellen der B-Zelllinie (Gedächtnis-B-Zellen (n = 5), polyklonale plasmatische Zellen (n = 5), Plasmazellen des Knochenmarks (n = 19)) ET-1.

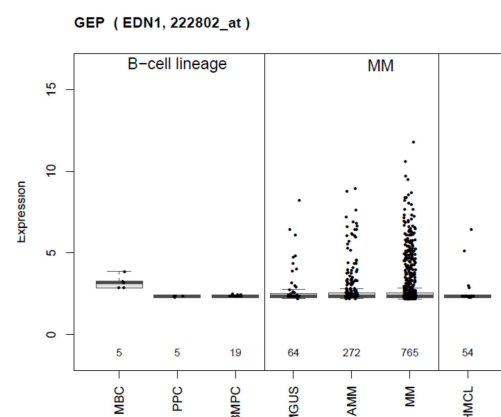


Abbildung 48: Relative Expressionsstärke von Endothelin 1 (ET-1) in primären normalen und malignen Plasmazellen, sowie Myelomzelllinien. Durch *gene expression profiling* (GEP) wurden in Gedächtnis-B-Zellen (MBC, n = 5), polyklonalen plasmablastischen Zellen (PPC, n = 5), normalen Plasmazellen des Knochenmarks (BMPC, n = 19)) gesunder Spender, Myelomzellen von Patienten mit monoklonaler Gammopathie unklarer

Signifikanz (MGUS; n = 64), asymptomatischem Multiplen Myelom (AMM, n = 272), therapiepflichtigem Multiplen Myelom (MM, n = 765)) und humanen Myelomzelllinien (HMCL n = 54) die relative Expressionsstärke von ET-1 (EDN1) bestimmt. Alle Zellen exprimieren ET-1 in vergleichbarer Expressionsstärke. Zur Unterscheidung „exprimiert/nicht exprimiert“ wurde eine Berechnung mittels PANP-Algorithmus durchgeführt.

3.8.2 Expression von ET_A- und ET_B-Rezeptoren

Um das Vorhandensein von ET_A- und ET_B-Rezeptoren in den von uns verwendeten Zelllinien zu bestätigen, wurde deren Expression zunächst auf mRNA Ebene mittels qPCR bestimmt. Die mRNA der ET_A-Rezeptoren konnte nur in KMM-1, KMS-12-BM und RPMI-8226 Zellen nachgewiesen werden (**Abbildung 49 (A)**). Der ET_B-Rezeptor wurde in allen Zelllinien außer KMS-12-BM und OPM-2 in unterschiedlicher Expressionshöhe nachgewiesen (**Abbildung 49 (B)**).

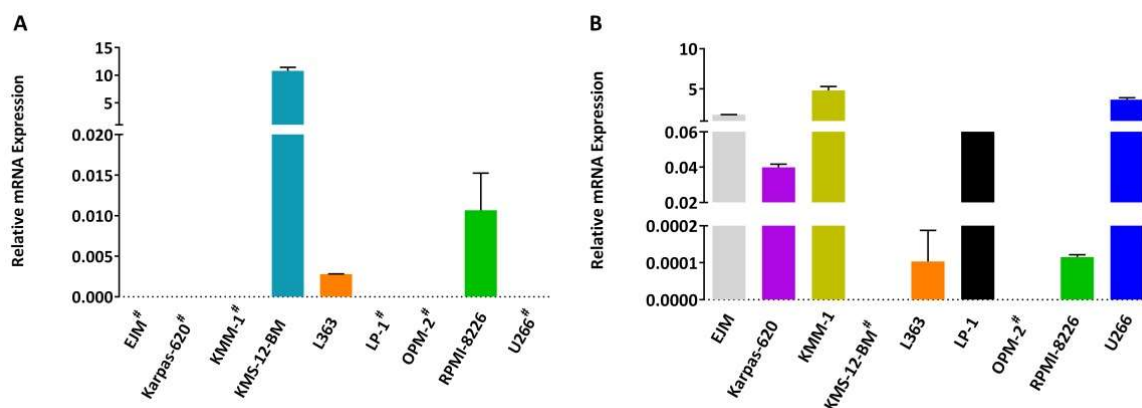


Abbildung 49: Bestimmung der Endothelin A- und Endothelin B- (ET_A und ET_B) Rezeptor-Expression auf mRNA Ebene in Zelllinien des Multiplen Myeloms. (A) Bestimmung der relativen ET_A-Rezeptor mRNA Expression in unbehandelten Zellen Multipler Myelomzelllinien (n = 9) mittels *quantitative polymerase chain reaction*. In der Zelllinie KMS-12-BM wurde die höchste Expression ermittelt. Für die mit „#“ gekennzeichneten Zelllinien lag die mRNA-Expression unter dem Detektionslimit. **(B)** Bestimmung der relativen ET_B-Rezeptor mRNA-Expression in unbehandelten Zellen Multipler Myelomzelllinien (n = 9). Der ET_B-Rezeptor wurde in allen Zelllinien mit den Ausnahmen von KMS-12-BM (#) und OPM-2 (#) exprimiert. In der Zelllinie KMM-1 wurde die höchste Expression ermittelt.

Die GEP in primären Zellen bestätigte die geringere Expression von ET_A-Rezeptoren im Vergleich zur ET_B-Rezeptor-Expression in malignen Plasmazellen von Patienten mit monoklonaler Gammopathie unklarer Signifikanz (MGUS, n = 64), asymptomatischem Multiplen Myelom (n = 272) und therapiepflichtigem Multiplen Myelom (n = 765), Zelllinien des Multiplen Myeloms (n = 54), Gedächtnis-B-Zellen (n = 5), polyklonale plasmatische Zellen (n = 5), Plasmazellen des Knochenmarks (n = 19) (**siehe Abbildung 50 (A)**). Der ET_B-Rezeptor wurde hingegen in allen mittels DNA-Mikroarray analysierten Proben stark exprimiert (**Abbildung 50 (B)**).

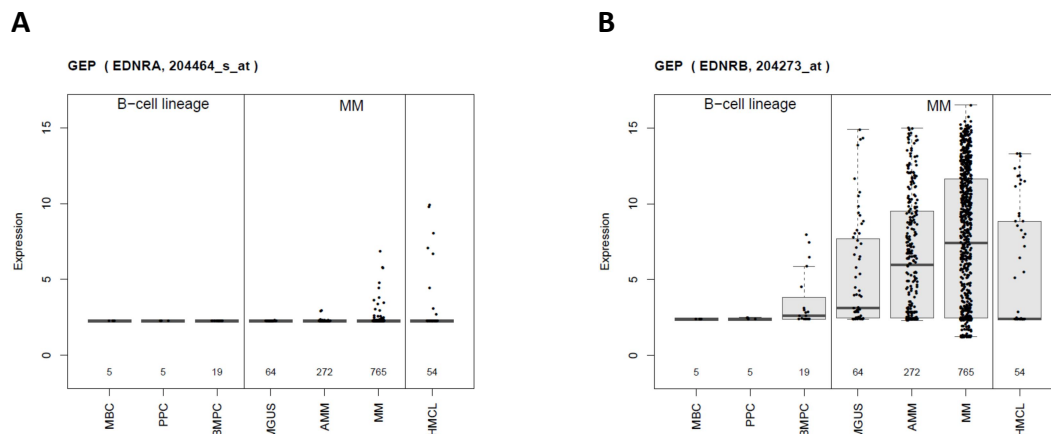


Abbildung 50: Relative Expressionsstärke von Endothelin A- und Endothelin B- (ET_A und ET_B) Rezeptoren in primären normalen und malignen Plasmazellen sowie Myelomzelllinien. Durch *gene expression profiling* wurden in (Gedächtnis-B-Zellen (MBC, n = 5), polyklonalen plasmablastischen Zellen (PPC, n = 5), Plasmazellen des Knochenmarks (BMPC, n = 19)) gesunder Spender, Myelomzellen von Patienten mit monoklonaler Gammopathie unklarer Signifikanz (MGUS; n = 64), asymptomatischem Multiplen Myelom (AMM, n = 272), therapiepflichtigem Multiplen Myelom (MM, n = 765)) und humanen Myelomzelllinien (HMCL n = 54) die relative Expressionsstärke von **(A)** ET_A -Rezeptoren (EDNRA) und **(B)** ET_B -Rezeptoren (EDNRB) bestimmt. ET_A -Rezeptoren wurden im Vergleich zu ET_B -Rezeptoren in den untersuchten Zellen geringer exprimiert. Zur Unterscheidung „exprimiert/nicht exprimiert“ wurde eine Berechnung mittels PANP-Algorithmus durchgeführt.

Zur relativen Bestimmung der Proteinmenge wurden die ET_B -Rezeptoren in den Zelllinien mittels Western Blot nachgewiesen (**Abbildung 51**). Alle Zelllinien zeigten eine Expression und damit ein Vorhandensein des ET_B -Rezeptors, wobei diese gemittelt über n = 6 Versuche in OPM-2 Zellen am höchsten und den LP-1 Zellen am niedrigsten war.

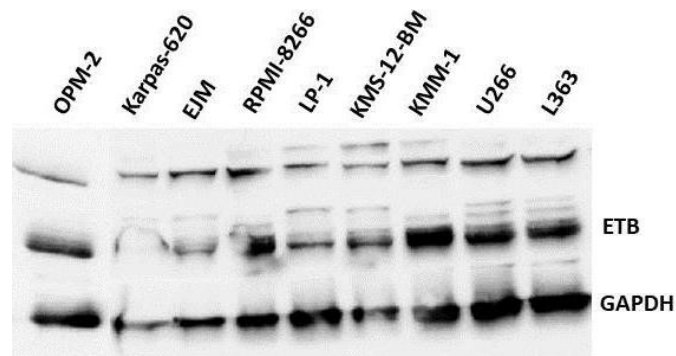


Abbildung 51: Exemplarische Darstellung der relativen Proteinquantifizierung des Endothelin B- (ET_B) Rezeptors in Zelllinien des Multiplen Myeloms. Alle untersuchten Myelomzelllinien (n = 9) wiesen im Western Blot eine quantifizierbare Menge Protein des ET_B -Rezeptors auf. Zur relativen Quantifizierung der Proteinmenge wurde die Expressionsstärke auf Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase (GAPDH) normiert.

Es konnte keine Korrelation der relativen mRNA Expression mit der in den Zelllinien ermittelten Proteinmenge gezeigt werden (**Abbildung 52**).

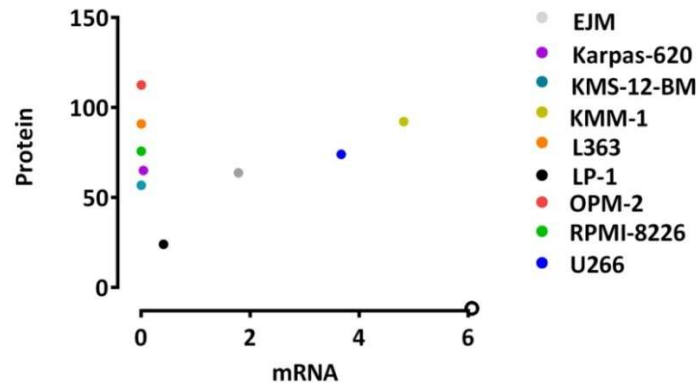
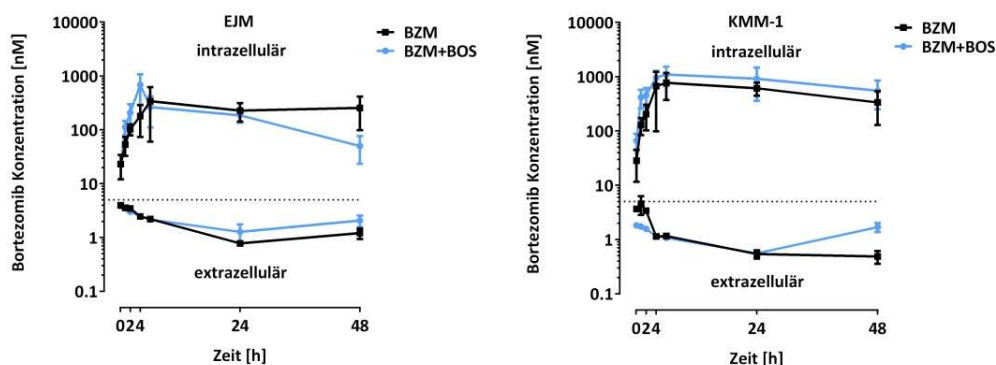


Abbildung 52: Korrelationsanalyse der für den ET_B -Rezeptor codierenden mRNA Menge zur ermittelten Proteinmenge. Es konnte keine Korrelation der relativen mRNA-Expression mit der in den Zelllinien ermittelten Proteinmenge für den ET_B -Rezeptor nachgewiesen werden. Die Korrelationsanalyse erfolgte mit Hilfe der nicht-parametrischen Spearman-Korrelation.

Eine Detektion des ET_A -Rezeptors in Zelllinien des Multiplen Myeloms mittels Western Blot konnte aufgrund unspezifischer Banden unter Verwendung aller drei bisher getesteten Antikörper nicht etabliert werden.

3.8.3 Intra- und extrazelluläre Anreicherung von Bortezomib in Kombination mit Bosentan in Zelllinien des Multiplen Myeloms

Die Kombination mit Bosentan hatte keinen Einfluss auf die zelluläre Aufnahme von Bortezomib in den exemplarisch getesteten Zelllinien des Multiplen Myeloms (EJM, KMM-1, LP-1 und OPM-2) (**Abbildung 53**). Bortezomib reichte sich in den 48 h der Exposition stark intrazellulär an (173-fach bis 625-fach für Bortezomib allein und 102-fach bis 799-fach in Kombination mit Bosentan). Tendenziell wurde die extrazelluläre Bortezomibkonzentration nach 48 h Expositionszeit in der Kombination mit Bosentan weniger reduziert im Vergleich zu der Konzentration nach 24 h, wie dies bei der Inkubation mit reinem Bortezomib der Fall war. Insgesamt wurde gezeigt, dass sich die intra- und extrazellulären Bortezomibkonzentrationen nach Exposition mit Bortezomib und Bosentan im Wesentlichen nicht von der nach Exposition mit Bortezomib allein unterschied.



Ergebnisse

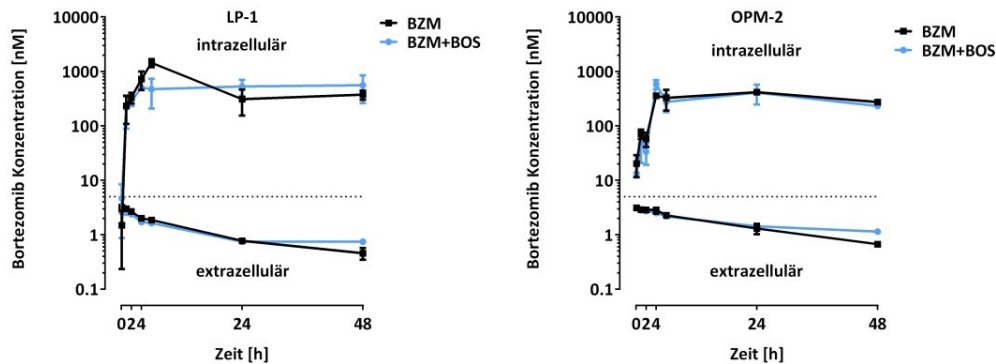


Abbildung 53: Intra- und extrazelluläre Bortezomibkonzentration [nM] in Myelomzelllinien und korrespondierendem Zellkulturüberständen nach 10 min, 1 h, 2 h, 4 h, 6 h, 24 h und 48 h Exposition gegenüber 5 nM Bortezomib allein oder in Kombination mit 100 μ M Bosentan. Gezeigt sind die Mittelwerte \pm Standardabweichung für $n = 3$ Messwerte der intra- und extrazellulären Bortezomibkonzentration nach Exposition exemplarisch ausgewählter Myelomzellen ($n = 4$) mit 5 nM Bortezomib allein (schwarz) in Kombination mit 100 μ M Bosentan (blau). Die zugegebene Bortezomibkonzentration von 5 nM wird durch eine gestrichelte Linie dargestellt. Die Zellen reichert Bortezomib Expositionszeit-abhängig, unabhängig davon ob dies als Einzelsubstanz oder in Kombination Bosentan exponiert wurde, stark intrazellulär an (173-625-fache intrazelluläre Anreicherung gegenüber dem Extrazellulärraum). Die Messwerte zeigten nur geringe interindividuelle Streuung zwischen den Zelllinien.

Es ergaben sich keine signifikanten Unterschiede für die AUCs nach Integration der intra- und extrazellulären Bortezomibkonzentrationen über 48 h (AUC_{0-48h}) zwischen der Einzelsubstanz und der Kombination mit Bosentan (**Abbildung 54**). Die mediane intrazelluläre Bortezomibakkumulation über den gesamten Expositionszeitraum lag bei 21294 nM x 48 h nach alleiniger Bortezomibinkubation bzw. 19716 nM x 48 h., wohingegen die entsprechenden extrazellulären Konzentrationen bei 60,23 nM x 48 h bzw. 64,83 nM x 48 h lagen.

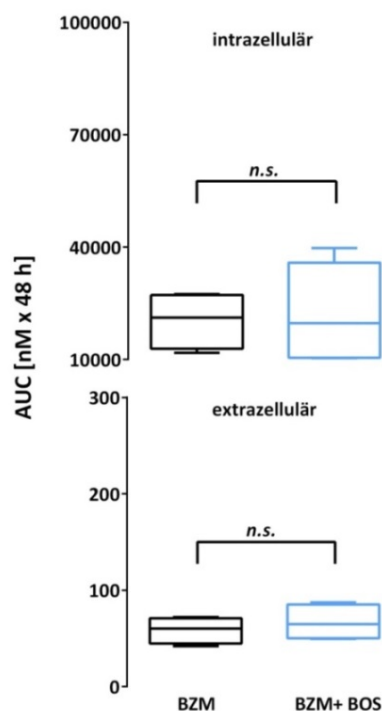


Abbildung 54: *Area under the curve (AUC)* [nM x 48 h] der intra- und extrazellulären Bortezomibkonzentration von Myelomzelllinien über einen Expositionszeitraum von 48 h mit 5 nM Bortezomib allein oder in Kombination mit 100 µM Bosentan. Dargestellt sind die medianen AUCs der intra- und extrazellulären Bortezomibkonzentrationen und deren Minima und Maxima. Die AUCs wurden berechnet aus der Bortezomibquantifizierung in Zellpellets von Myelomzelllinien ($n = 4$) und korrespondierendem Zellkulturmedium. Die intra- und extrazellulären AUCs zeigten keine signifikanten Unterschiede für 5 nM Bortezomib allein oder in Kombination mit 100 µM Bosentan. Die statistische Analyse wurde mittels Kruskal-Wallis Test mit *post hoc Dunn's multiple comparison* Test durchgeführt.

3.8.4 Einfluss von Bortezomib allein oder in Kombination mit ET-1 und Endothelinrezeptor-Antagonisten auf die Viabilität von Zelllinien des Multiplen Myeloms nach 48 h Exposition

Bosentan allein hatte bis zu einer Konzentration von 20 µM keinen Effekt auf die Zellviabilität, wohingegen 100 µM die Zellviabilität in KMM-1 um 29 % und RPMI-8226 um 37 % senkte (**Abbildung 55**).

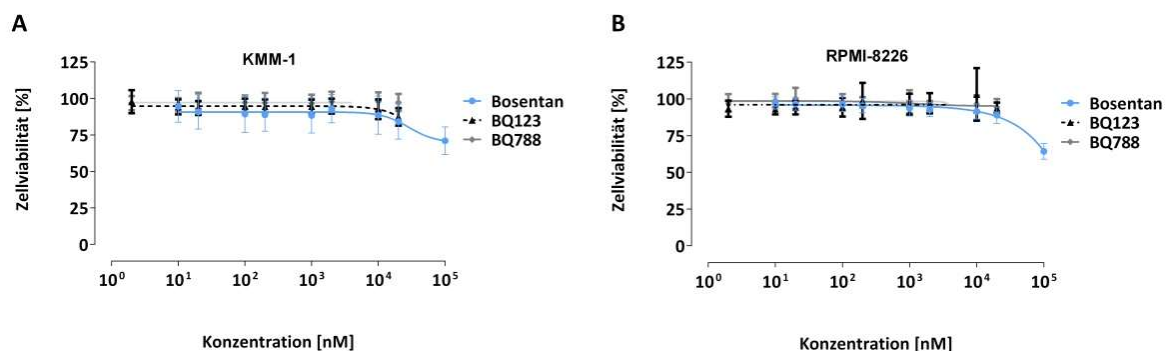


Abbildung 55: Exemplarische Darstellung des Konzentrations-abhängigen Einfluss von Bosentan, BQ123 oder BQ788 auf die Zellviabilität [%] der Myelomzelllinien KMM-1 und RPMI-8226 nach 48 h Expositionszeit. Gezeigt werden die Mittelwerte \pm Standardabweichung der Messwerte ($n = 32$) (4 biologische Replikate und jede Konzentrationen in 8 technischen Replikaten) nach 48 h Exposition der Myelomzelllinien (A) KMM-1 und (B) RPMI-8226 mit 0,01-100 µM Bosentan bzw. 0,002-20 µM BQ123 oder BQ788. Bosentan reduzierte nur in der höchsten Konzentration (100 µM) die Zellviabilität um maximal 37 %.

Um einen möglichen kombinatorischen antiproliferativen Effekt von Bortezomib und einem dualen Endothelinrezeptor-Antagonisten zu ermitteln, wurden die Zelllinien mit Bortezomib allein bzw. in Kombination mit 100 µM Bosentan für 48 h exponiert. Die Potenz von Bortezomib (IC_{50}) variierte von 2,16 nM (KMS-12-BM) bis hin zu 19,2 nM (OPM-2) (**Abbildung 56**). Die Kombination mit 100 µM Bosentan führte in LP-1 ($p = 0,0076$) und RPMI-8226 ($p = 0,0056$) zu einer gesteigerten Potenz von Bortezomib in Bezug auf die Reduktion der Viabilität (**Abbildung 56**). Dieser Trend konnte außerdem in den Zelllinien EJM, KMM-1 und OPM-2 gezeigt werden.

Um weiter zu klären, ob dieser Effekt nur auf die Blockade einer der beiden Endothelinrezeptoren zurückzuführen ist, wurden 0,1 µM bzw. 10 µM der selektiven Endothelinrezeptor-Antagonisten BQ123 und BQ788, sowie 100 nM ET-1 ebenfalls mit variierenden Konzentrationen von Bortezomib kombiniert. Die beiden verschiedenen Konzentrationen der spezifischen Endothelin-rezeptor-Antagonisten wurden gewählt, um ggf. eine konzentrationsabhängige Rezeptor-selektivität zu berücksichtigen. 100 nM ET-1 und 10 µM BQ788 zeigten in Kombination mit Bortezomib keinen Effekt auf die antiproliferative Potenz des Proteasomeninhibitors in den getesteten Zelllinien (**Abbildung 56**). Die Kombination mit 10 µM BQ123 und BQ788 mit Bortezomib führte zu einer

signifikant niedrigeren Sensitivität gegenüber Bortezomib in der Zelllinie KMS-12-BM ($p = 0,0206$ für BQ123 und $p = 0,0387$ für BQ788), wohingegen in allen anderen Zelllinien kein Effekt beobachtet wurde. Einen signifikanten Effekt von $0,1 \mu\text{M}$ BQ123 gegenüber der Behandlung von Bortezomib allein war lediglich in der Zelllinie LP-1 zu beobachten (siehe **Anhang 7.5.1, Abbildung A.18**).

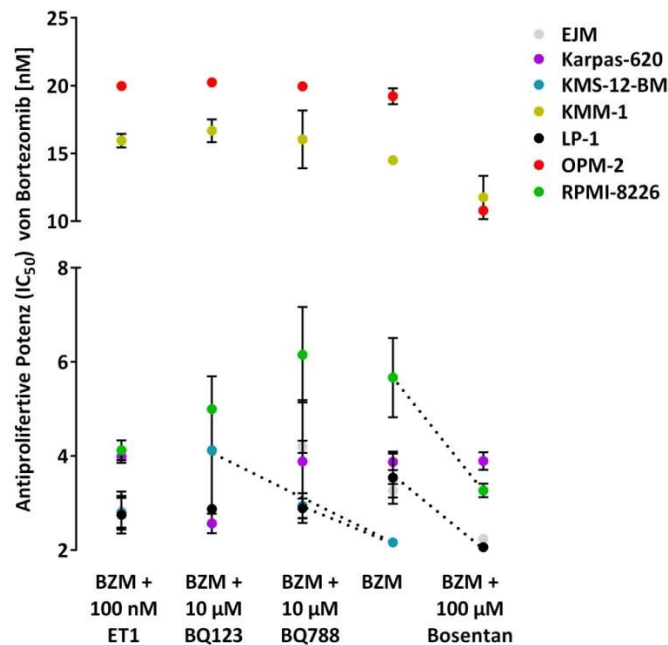


Abbildung 56: Vergleich der IC_{50} nach 48 h Exposition mit Bortezomib allein oder in Kombination mit $100 \mu\text{M}$ Bosentan, 100 nM ET-1, $10 \mu\text{M}$ BQ123 oder BQ788 in Bezug auf die Zellviabilität von Myelomzelllinien. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm Standardabweichung der antiproliferativen Potenz (IC_{50}) von Bortezomib ($n = 4$ biologische Replikate) nach 48-stündiger Exposition der Myelomzelllinien ($n = 7$) gegenüber $0,002$ - $10 \mu\text{M}$ Bortezomib allein oder in Kombination mit 100 nM ET-1, $100 \mu\text{M}$ Bosentan, $10 \mu\text{M}$ BQ123 oder BQ788. Die Kombination von Bortezomib mit $100 \mu\text{M}$ Bosentan führte in den Zelllinien LP-1 ($p = 0,0076$) und RPMI-8226 ($p = 0,0056$) zu einer gesteigerten Wirksamkeit von Bortezomib in Bezug auf die Reduktion der Viabilität. Im Gegensatz dazu zeigte die Kombination von Bortezomib mit $10 \mu\text{M}$ BQ123 und BQ788 eine Reduktion der Sensitivität gegenüber Bortezomib in der Zelllinie KMS-12-BM ($p = 0,0206$ für BQ123 und $p = 0,0387$ für BQ788). Die statistische Analyse wurde mittels Kruskal-Wallis Test mit *post hoc* Dunn's multiple comparison Test durchgeführt.

3.8.5 Inhibitorische Potenz von Bortezomib allein oder in Kombination mit $100 \mu\text{M}$ Bosentan auf die Zellviabilität von Myelomzelllinien nach 5 Tagen Expositionszeit

Nach verlängerter Expositionszeit konnte keine synergistische antiproliferative Wirksamkeit von Bortezomib in Kombination mit $100 \mu\text{M}$ Bosentan gezeigt werden (**Tabelle 32, Abbildung A.19**). Im Gegenteil, bei den Zelllinien Karpas-620, KMM-1, KMS-12-BM und RPMI-8226 wurde eine signifikante Erhöhung der IC_{50} für die Kombination mit dem dualen Endothelinrezeptor-Antagonisten gezeigt

Tabelle 32: Inhibitorische Potenz (IC_{50}) von Bortezomib allein oder in Kombination mit $100 \mu\text{M}$ Bosentan auf die Zellviabilität [%] von Myelomzelllinien nach 5 Tagen Expositionszeit

Zelllinie	IC_{50} nach Exposition mit variierenden	IC_{50} nach Exposition mit variierenden
-----------	---	---

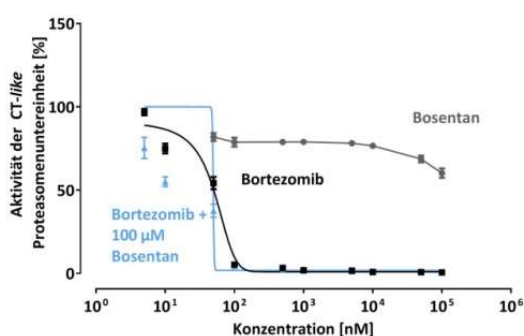
	Konzentrationen Bortezomib [nM]	Konzentrationen Bortezomib + 100 μ M Bosentan [nM]
EJM	2,04	2,21
Karpas-620	5,22	7,14*
KMM-1	4,72	7,48*
KMS-12-BM	6,02	8,12*
L363	6,22	6,06
LP-1	4,23	3,88
OPM-2	8,39	8,90
RPMI-8226	6,40	7,68*
U266	3,83	5,80
Mittelwert	5,27	6,44
SD	$\pm 1,84$	$\pm 2,16$

Die signifikante Erhöhung der IC₅₀ wird in Tabelle 32 durch einen * markiert.

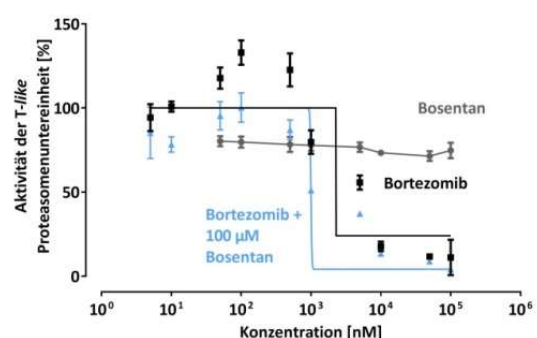
3.8.6 Einfluss von Endothelinrezeptor-Antagonisten auf die Aktivität der Proteasomenuntereinheiten in Myelomzelllinien

Bosentan hatte keinen Einfluss auf die Aktivität der T- und C-like Untereinheit, wohingegen in drei der getesteten Zelllinien (EJM, RPMI-8226 und KMM-1) die Aktivität der CT-like Proteasomenuntereinheit um 32-40 % gesenkt wurde (exemplarisch in der **Abbildung 57 (A)** für die Zelllinie KMM-1 gezeigt). Bosentan in Kombination mit Bortezomib veränderte die Potenz von Bortezomib in Bezug auf die Inhibition des Proteasoms im Vergleich zur Inkubation mit dem Wirkstoff alleine nicht (**Abbildung 57**). Es wurde auch eine kompensatorischen Steigerung der T-like Proteasomenuntereinheit nach Exposition der Zellen mit Bortezomib bzw. Bortezomib in Kombination mit Bosentan in den Zelllinien EJM, KMM-1 und OPM-2 gezeigt (exemplarisch in der **Abbildung 57 (B)**).

A



B



C

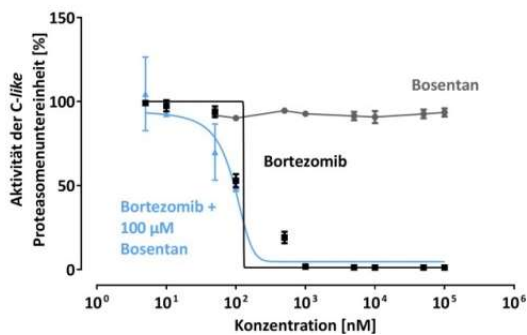


Abbildung 57: Exemplarische Darstellung des Einflusses von Bosentan bzw. Bosentan in Kombination mit Bortezomib im Vergleich zu Bortezomib allein auf die Aktivität der Proteasomenuntereinheiten der Myelomzelllinie KMM-1. In der Graphik werden die Mittelwerte \pm Standardabweichung von $n = 3$ Messwerten der Aktivität der CT-, T- und C-like Proteasomenuntereinheiten nach Exposition der Zelllinie KMM-1 mit 0,05-100 μ M Bosentan, 0,005-100 μ M Bortezomib allein oder in Kombination mit 100 μ M Bosentan gezeigt. **(A)** Die Aktivität der CT-like Proteasomenuntereinheit in KMM-1 Zellen wurde durch hohe Konzentrationen von Bosentan (100 μ M) um 32 % gesenkt. Die Inhibition der CT-like Proteasomenuntereinheit durch Bortezomib wurde durch den Zusatz von 100 μ M Bosentan nicht verändert. **(B)** Bosentan allein hatte keinen Effekt auf die Aktivität der T-like Proteasomenuntereinheit, wohingegen es unter Bortezomib bzw. Bortezomib + 100 μ M Bosentan zur charakteristischen Aktivitätssteigerung der katalytischen Aktivität kam. **(C)** Bosentan hatte weder einen direkten Einfluss auf die Aktivität der C-like Proteasomenuntereinheit, noch auf die inhibitorische Wirksamkeit von Bortezomib.

3.8.7 Untersuchung der Zytotoxizität von 100 μ M Bosentan

Um den unspezifischen Einfluss auf die Proteasomenaktivität und Viabilität von Bosentan durch Zytotoxizität auszuschließen, wurden die Effekte von 100 μ M Bosentan auf die Zelllinien EJM, Karpas-620, KMM-1, KMS-12-BM, L363, LP-1, OPM-2 und RPMI-8226 im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle und 1 %-igem Triton getestet. Es konnte kein zytotoxischer Effekt von Bosentan in der verwendeten Konzentration gezeigt werden (**Abbildung 58**).

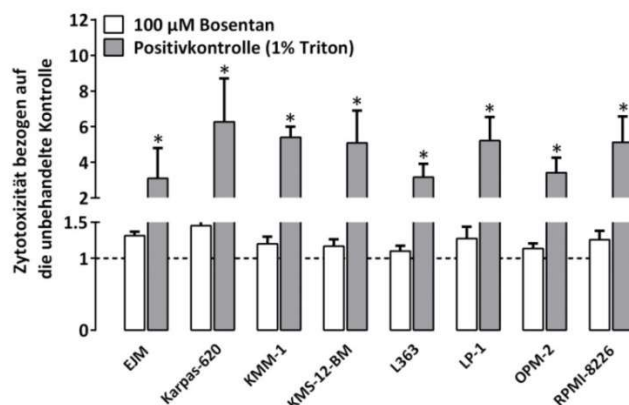


Abbildung 58: Zytotoxizität von 100 μ M Bosentan in Zelllinien des Multiplen Myeloms. Gezeigt sind die Mittelwerte \pm Standardabweichung für $n = 3$ Messwerte für die Zytotoxizität, bezogen auf die unbehandelte Kontrolle nach Exposition der untersuchten Myelomzelllinien ($n = 8$) mit 100 μ M Bosentan oder 1 %-iger Triton X-100 Lösung (Positivkontrolle). Die Zytotoxizität wurde durch die Quantifizierung der freigesetzten Laktatdehydrogenase (LDH) Menge bestimmt. Es konnte kein zytotoxischer Effekt von 100 μ M Bosentan gezeigt werden.

4. Diskussion

Mit der Markteinführung von Bortezomib und damit der Wirkstoffklasse der Proteasomeninhibitoren hat sich das Behandlungsspektrum für Patienten mit Multiplem Myelom deutlich erweitert. Neben den bereits etablierten Applikationswegen wurde innerhalb des SFB TRR79 ein lokal in den Knochenläsionen positioniertes Bortezomib-freisetzendes Knochenersatz-material experimentell *in vitro* und in Ratten- und Mausmodellen getestet (unveröffentlichte Daten SFB TRR79). Ein wichtiger Beitrag zur Sicherheit und Wirksamkeit im Hinblick auf den lokalen Einsatz in den ossären Läsionen bildet hierbei die Wahl einer geeigneten Bortezomibdosis *in vivo*. Die Freisetzung von Bortezomib sollte so determiniert werden, dass zum einen eine selektive antiproliferative Wirksamkeit gegenüber den malignen Plasmazellen gewährleistet ist und zum anderen keine apoptotischen Effekte auf das umliegende gesunde Gewebe auftreten. Zur Klärung dieser Fragestellung wurde in der vorliegenden Arbeit untersucht, ob für eine Exposition mit einer Bortezomibkonzentration von 5 nM Sensitivitätsunterschiede gegenüber Bortezomib auf eine unterschiedliche zelluläre Pharmakokinetik, Pharmakodynamik oder variierende Expressions-muster der katalytischen Proteasomenuntereinheiten zurückzuführen sind. Hierfür wurde erstmalig *in vitro* die intrazelluläre Bortezomibkinetik in primären Myelomzellen, MSC und Osteoblasten mittels einer validierten UPLC/MS/MS Methode bestimmt. Simultan wurden die pharmakodynamischen Effektgrößen Proteasomeninhibition und Auswirkungen auf die Reduktion der Zellviabilität durch Bortezomib in Abhängigkeit von der Konzentration und Expositionszeit in MSC und Osteoblasten bestimmt. Dabei wurden die MSC und daraus *in vitro* differenzierte Osteoblasten von gesunden Normalspendern und neu diagnostizierten, therapiepflichtigen Patienten mit Multiplem Myelom verglichen. Ebenso wurde die Expression der katalytischen konstitutiven und Immun-Proteasomenuntereinheiten auf Eignung als prognostischen Marker in Bezug auf das ereignisfreie Überleben und Gesamtüberleben von Myelompatienten untersucht. Aufgrund der besseren klinischen Wirksamkeit von Bortezomib innerhalb von Kombinationstherapieregimen wurde geprüft, ob die Wirkstoffkombinationen zu einer höheren Anreicherung und Wirksamkeit von Bortezomib in malignen Zellen führen (Murray et al., 2014; Raab et al., 2009).

Die bereits von unserer Arbeitsgruppe publizierte UPLC/MS/MS Methode zur Quantifizierung von Bortezomib konnte hinsichtlich des SPE-Extraktionsverfahrens optimiert und validiert werden. Die Kultur primärer Myelomzellen, MSC und deren Differenzierung zu Osteoblasten wurde nach aktuellen Standards adaptiert und etabliert (Dominici et al., 2006). Die intrazelluläre Bortezomibquantifizierung in diesen Zellen zeigte überraschenderweise eine geringe Anreicherung des Wirkstoffs in primären Myelomzellen und Osteoblasten, wohingegen in MSC vergleichbar mit Zelllinien des Multiplen Myeloms hohe intrazelluläre Bortezomibkonzentrationen nachgewiesen wurden. MSC und Osteoblasten von Normalspendern unterschieden sich trotz der interindividuellen Schwankungen nicht gegenüber denen von Patienten. In Anbetracht der vorangegangenen Studien, in denen B-Zellen gesunder Spender relativ resistent gegenüber Bortezomib waren (Meister et al., 2007), zeigten sich auch MSC und Osteoblasten weniger sensitiv gegenüber den antiproliferativen Effekten von Bortezomib im Vergleich zu Multiplen Myelomzellen. Zumindest über einen Expositionszeitraum von 48 h war dies der Fall, allerdings nach 5-tägiger Exposition zeigten sich manche der untersuchten MSC sensitiv gegenüber Bortezomib. Die Aktivität der CT- und C-like Proteasomenuntereinheiten wurden in MSC und Osteoblasten im Vergleich zu Myelomzelllinien durch Bortezomib sogar potenter inhibiert.

Die untersuchten Zellen unterschieden sich nicht hinsichtlich ihrer Expressionsmuster der CT-, T-, oder C-like Proteasomenuntereinheit, sowie deren korrespondierenden Untereinheiten des Immunproteasoms. Eindeutige, mit bisherigem Wissensstand erklärbare Zusammenhänge zwischen der intrazellulären Anreicherung bzw. inhibitorischen Potenz von Bortezomib an den Proteasomenuntereinheiten konnten in Myelomzelllinien nicht beschrieben werden. Ebenso war die Expression der verschiedenen Proteasomenuntereinheiten kein prädiktiver Faktor für das ereignisfreie Überleben oder Gesamtüberleben.

Für Bortezomib innerhalb der Kombinationstherapieregime konnte gezeigt werden, dass die überlegene klinische Wirksamkeit in diesen Regimen nicht auf eine veränderte zelluläre Pharmakokinetik bzw. veränderte intrazelluläre Akkumulation zurückzuführen ist. Doxorubicin, Dexamethason, Melphalan und Prednisolon können zwar die inhibitorische Potenz von Bortezomib an der CT-like Untereinheit verstärken, allerdings konnte nicht abschließend geklärt werden, ob dieser Effekt tatsächlich ausschlaggebend ist, um die antiproliferative Wirksamkeit von Bortezomib in Multiplen Myelomzellen zu erhöhen. Höchstwahrscheinlich ist die überlegene Wirksamkeit der Kombinationstherapieregime auf die unterschiedlichen pharmakologischen *targets* (z.B. DNA, Zytoskelett, Transkriptionsfaktoren) bzw. Wirkmechanismen der Einzelkomponenten zurückzuführen.

In Myelomzelllinien konnte gezeigt werden, dass der ET-1 Signalweg basal aktiv ist, wobei der ET_B-Rezeptor wesentlich stärker als der ET_A-Rezeptor exprimiert wird. Die in der Literatur beschriebene potentere antiproliferative Wirksamkeit von Bortezomib in Kombination mit dem dualen Endothelinrezeptor-Antagonisten Bosentan (Russignan et al., 2017) konnte nicht auf eine veränderte zelluläre Pharmakokinetik von Bortezomib zurückgeführt werden. Die Kombination von Bortezomib mit Bosentan führte lediglich in zwei der untersuchten Zelllinien zu Viabilitätseinbußen, wohingegen für die Kombination mit den selektiven Endothelinrezeptor-Antagonisten BQ123 und BQ788 sowie ET-1 keine Effekte auf die Zellviabilität beobachtet werden konnten. Der mögliche Synergismus zwischen Bortezomib und Bosentan, welcher augenscheinlich mechanistisch über den Endothelinsignalweg hinausgeht, konnte nicht auf eine potentere Inhibition der Proteasomenuntereinheiten oder Zytotoxizität von Bosentan zurückgeführt werden.

4.1 Methodenentwicklung und Etablierung

4.1.1 Etablierung der Kultur von MSC und Osteoblasten sowie deren Charakterisierung nach ISCT Richtlinien

Die durch das Labor für Myelomforschung der Abteilung Innere Medizin V des Universitätsklinikums Heidelberg etablierte Isolation der MSC aus Knochenmarkaspirat von Normal Spendern und Patienten führte reproduzierbar zu *in vitro* kultivierbaren MSC. In allen experimentell verwendeten Zellpopulationen konnten die folgenden von der ISCT geforderten Kriterien nachgewiesen werden (Dominici et al., 2006):

- Plastikadhärenz der Zellen
- positive Expression der Oberflächenantigene CD73, CD90, CD105
- fehlende Expression von CD14, CD19, CD34, CD45 und HLA-DR Antigenen,
- osteogene und adipogene Differenzierungsfähigkeit
- Expansionsfähigkeit *in vitro*

Neben der Qualität der Isolation der MSC aus verschiedenen Geweben wird als Einflussfaktor bei der Kultur von MSC das verwendete Zellkulturmedium und dessen Zusätze, insbesondere FCS intensiv

diskutiert (Ho et al., 2008; Lennon and Caplan, 2006; Mushahary et al., 2018; Sotiropoulou et al., 2006). Durch variable Chargen von FCS kann neben der Morphologie, der Proliferationskapazität und der Adhärenz auch das Differenzierungspotential der Zellen maßgeblich beeinflusst werden. Zur Reduktion dieses Einflusses wurde für die Kultivierung der MSC das Basismedium, sowie die verwendete FCS-Charge während des gesamten Versuchszeitraums nicht verändert. Für die osteogene und adipogene Differenzierung wurde ebenfalls das zuvor experimentell festgelegt DMEM Basismedium, sowie die Chargen für FCS und Differenzierungszusätze während des gesamten Versuchszeitraums beibehalten. Neben der Wahl der Kulturmedien und Zusätze haben auch Zelldichte, Passagierung und Kultivierungsdauer Einfluss auf die Charakteristika von MSC (Gregory et al., 2005; Reyes et al., 2001; Reyes and Verfaillie, 2001). Bei der Aussaat der Zellen nach Passagierung wurde daher die abnehmende Proliferationskapazität mit steigender initial ausgesäter Zellzahl berücksichtigt (Bartmann et al., 2007). Die Zelldichte und Dauer der Kultivierung wirken sich auch auf das Expressionsmuster und die Chromosomenaberrationen der Zellen aus (Aguilar et al., 2007; Gregory et al., 2003). Die Zellen wurden daher bei 80-90 % Dichte maximal sechsmal passagiert. MSC von Spendern und Patienten unterschieden sich wie in der Literatur beschrieben nicht in ihrer Expansionsfähigkeit und Aktivität der ALP (Corre et al., 2007). Interindividuelle Unterschiede in der Ausgangspopulation verschiedener Spender in Bezug auf die Proliferations- und Differenzierungskapazität wurden wie ebenfalls zuvor beschrieben beobachtet (Digirolamo et al., 1999; Muraglia et al., 2000; Pittenger et al., 1999). Zudem zeigten MSC auch innerhalb der gleichen Ausgangspopulation eine unterschiedliche Morphologie (Colter et al., 2000; Digirolamo et al., 1999; Sekiya et al., 2002; Vogel et al., 2003). Grob konnten diese in zwei Kategorien unterteilt werden, zum einen Zellen mit einer spindelförmigen Morphologie mit hoher Proliferationskapazität und demgegenüber Zellen mit einem größeren Zellvolumen, die nur noch geringe Proliferationskapazität aufwiesen. Der mittlere Zelldurchmesser von 20 µm stimmte mit den in der Literatur publizierten Daten überein (Ge et al., 2014). Die Heterogenität der einzelnen Zellpopulation an sich, sowie auch interindividuell, spiegelt sich in den Ergebnissen der durchflusszytometrischen sowie histochemischen Charakterisierung der MSC wider.

4.1.2 Adaption und Validierung der optimierten UPLC/MS/MS Methode zur Quantifizierung von Bortezomib in primären Zellen, MSC und Osteoblasten

Die hochsensitive Quantifizierung von Bortezomib mittels UPLC/MS/MS in Kombination mit einer LLE-Methode wurde bereits im Vorfeld in der Arbeitsgruppe etabliert und validiert (Clemens et al., 2014). Diese Methode wurde an die limitierten Zellzahlen von primären Myelomzellen MSC und Osteoblasten adaptiert. In einem Vorversuch wurde zunächst gezeigt, dass eine Quantifizierung von Bortezomib nach Exposition von bis zu 5×10^4 Karpas-620 Zellen/Pellet mit 5 nM des Wirkstoffs über eine Expositionszeit bis zu 48 h weit über dem LLOQ quantifizierbar ist. Ebenfalls wurde sichergestellt, dass die zur Kalibrierung und QC-Kontrolle verwendeten P388 Zellpellets in den Matrixeigenschaften und damit die Extraktionsrate von Bortezomib mit denen aus MSC- oder Osteoblasten-Pellets vergleichbar ist.

Die SPE stellt neben der LLE eine einfache, reproduzierbare und effiziente Extraktionsmethode in der Bioanalytik von kleinen Wirkstoffen, Proteinen und Peptiden dar (Boyaci et al., 2015; Kole et al., 2011). Zur Optimierung der Methode unter dem Gesichtspunkt der Minimierung von Matrixeffekten wurde eine Extraktion von Bortezomib mittels SPE etabliert und validiert (FDA, 2018; EMA, 2011; (Davis et al., 1978)). Die Matrixeffekte durch koeluiierende Probenkomponenten und die damit

verbundene Signalsuppression durch fehlende Ionenbildung des Analyten konnten durch das Verfahren deutlich reduziert werden.

4.2 Vergleich der zellulären Pharmakokinetik und Pharmakodynamik von Bortezomib in primären Myelomzellen, Zelllinien des Multiplen Myeloms, MSC und Osteoblasten

Bortezomib hat nach systemischer Applikation eine kurze Plasmahalbwertszeit und ein hohes Verteilungsvolumen bei 83 % Plasmaproteinbindung (Schwartz and Davidson, 2004; Tan et al., 2018). Der Wirkstoff zeigt eine hohe Selektivität für die Inhibition von Proteasomenuntereinheiten in malignen Plasmazellen. Ausgeprägte zelluläre Sensitivitätsunterschiede gegenüber Bortezomib wurden beschrieben, deren zugrundeliegenden Mechanismen weiterhin unaufgeklärt sind (Hideshima et al., 2001c). Kombiniert man diese Erkenntnisse, deuten diese Daten auf eine schnelle Distribution zu den entsprechenden Geweben und damit auch auf eine hohe zelluläre Anreicherung in den malignen Plasmazellen hin. Dies führt folgerichtig zu selektiver und potenter Wirkung in diesen Zellen. Allerdings konnte trotz dieser hohen Anreicherung von Bortezomib in Zelllinien des Multiplen Myeloms in vorangegangenen Arbeiten unserer Gruppe keine Korrelation zwischen intrazellulärer Konzentration und der pharmakodynamischen Wirkung oder Wirksamkeit gezeigt werden (Clemens et al., 2015; Dettmer et al., 2016). Neben der Klärung der Frage des Zusammenhangs zwischen zellulärer Pharmakokinetik bzw. Pharmakodynamik und der Selektivität von Bortezomib, muss im Kontext der lokalen Applikation die Konzentrations- und Expositionszeit-abhängige Sensitivität gegenüber Bortezomib in malignen und insbesondere gesunden Zellen der Knochenmark-Mikroumgebung einbezogen werden. Zur Vermeidung von apoptotischen Effekten auf das umliegende Knochengewebe, sollten erstmals Konzentrations-Wirkungsbeziehungen von Bortezomib in MSC und Osteoblasten beschrieben werden.

Die extensive, Konzentrations- und Expositionszeit-abhängige Anreicherung von Bortezomib in Myelomzelllinien konnte zunächst in primären Myelomzellen von unbehandelten Patienten nicht reproduziert werden. Eine intrazelluläre Anreicherung von Bortezomib gegenüber dem Extrazellulärraum wurde beobachtet, allerdings in wesentlich geringerem Ausmaß als dies in den Zelllinien der Fall war. Betrachtet man die Unterschiede zwischen primären Zellen und stabilen Zelllinien, könnte dies auf die eingeschränkte Kultivierbarkeit von primären Zellen, sowie deren eingeschränkte Teilungsfähigkeit zurückzuführen sein. In den MSC von Patienten und Probanden konnte hingegen eine mit denen in Zelllinien des Multiplen Myeloms vergleichbare intrazelluläre Bortezomibkonzentration gezeigt werden. In den ausdifferenzierten Osteoblasten streute die intrazelluläre Bortezomibkonzentration stark zwischen den einzelnen Normalspendern und den Probanden. Die Osteoblasten reicherten im Mittel eine mit denen in primären malignen Plasmazellen vergleichbare Bortezomibkonzentration an. Auch ausdifferenzierte Osteoblasten teilten sich *in vitro* nicht mehr, was die Theorie der erhöhten Bortezomibanreicherung in sich schneller teilenden Zellen untermauert (Kassem et al., 1997). Neben diesem Aspekt können die methodischen Schwierigkeiten des Ablösens der kalzifizierten Osteoblasten aus den Zellkulturplatten, das Zählen der hochgradig agglomerierten Zellen, sowie das erschwerte Pelletieren im Vergleich zu den MSC und Zelllinien des Multiplen Myeloms zur starken interindividuellen Schwankung geführt haben.

Die MSC und Osteoblasten der Normalspender und Patienten zeigten keine Veränderung der Sensitivität gegenüber Bortezomib nach 48-stündiger Exposition. Die IC₅₀-Werte für Bortezomib in

Myelomzellen stimmten für diesen Inkubationszeitraum mit den bereits publizierten Daten überein (Shabaneh et al., 2013). Hohe Bortezomibkonzentrationen bis zu 500 μM führten zwar zu Viabilitätseinbußen, jedoch nicht zum vollständigen Zelltod. Bei einer verlängerten Expositionszeit auf 5 Tage waren die MSC einiger Spender sehr sensitiv gegenüber Bortezomib. Die IC_{50} -Werte der entsprechenden MSC waren deutlich niedriger als die der Myelomzelllinien nach gleicher Exposition. Dies widerspricht der bisher angenommenen Selektivität von Bortezomib gegenüber malignen Plasmazellen und sollte im Kontext eines lokal freisetzenen Knochenersatzmaterials z.B. bei Überlegungen zur eingebrachten Dosis und Freisetzungskinetik beachtet werden. Es konnte in dieser Arbeit allerdings nicht abschließend geklärt werden, worauf diese Unterschiede zurückzuführen sind, die unabhängig von der Herkunft der Zellen aus Normalspendern oder Patienten auftraten.

Um einen möglichen Zusammenhang zwischen der unterschiedlichen antiproliferativen Wirksamkeit und der Inhibition der Proteasomenaktivität durch Bortezomib zu evaluieren, wurde zunächst dessen inhibitorische Potenz in den verschiedenen Zelltypen bestimmt. Aufgrund der limitierten Zellzahl primärer Myelomzellen konnte in diesen Zellen keine inhibitorische Potenz von Bortezomib an den CT-, T- und C-like Proteasomenuntereinheiten bestimmt werden. Zusammenfassend wurde in MSC und Osteoblasten von Normalspendern und Patienten erwartungsgemäß die CT-like Untereinheit mit der höchsten Potenz inhibiert. Die C-like Untereinheit wurde mit vergleichsweise niedriger Wirksamkeit in ihrer enzymatischen Aktivität gehemmt, wohingegen es bei der T-like Untereinheit zu einer leichten Aktivitätssteigerung bei niedrigen Bortezomibkonzentrationen kam. Die inhibitorische Potenz von Bortezomib in Bezug auf die Hemmung der CT-like Untereinheiten war in MSC und Osteoblasten mit der in Myelomzelllinien vergleichbar bzw. sogar leicht stärker in den nicht malignen Zellen ausgeprägt. Die für Bortezomib charakteristische potente Hemmung der CT-like Proteasomenuntereinheit sowie die kompensatorische Aktivitätssteigerung der T-like Proteasomenuntereinheit wurden auch bei variierender Expositionszeit bei gleicher Wirkstoffkonzentration in MSC und Osteoblasten beobachtet (Shabaneh et al., 2013). Obwohl die Zellen unabhängig von ihrem Ursprung bzw. Zelltyp sehr stark interindividuell in ihrer Aktivität der Proteasomenuntereinheiten variierten, war ein einheitlicher Trend erkennbar:

- (1) Je länger (bis 24 h Expositionszeit) die beiden Zelltypen mit 5 nM Bortezomib exponiert wurden, desto effektiver wurde sowohl die CT-, als auch die C-like Proteasomenuntereinheit funktionell gehemmt.
- (2) Nach 48 h Inkubation wurde die CT-like Aktivität jedoch nicht weiter reduziert, sondern im Gegenteil meist wieder minimal gesteigert.

Eine Proteasomenhemmung durch Bortezomib in Osteoblasten und insbesondere MSC war im Hinblick auf das osteoanabole Wirkprofil von Bortezomib zu erwarten. Bereits publizierte Arbeiten zeigen u.a., dass eine durch niedrige Bortezomibkonzentrationen hervorgerufene Proteasomeninhibition und damit einhergehende Akkumulation von Signalmolekülen zur Differenzierung von MSC zu Osteoblasten führt (Giuliani et al., 2007; Qiang et al., 2009). Somit trägt die Proteasomenhemmung in MSC und Osteoblasten zur klinischen Wirksamkeit von Bortezomib bei und der Unterschied in der Wirkung von Bortezomib in den Myelomzellen und den gesunden Zellen in der Knochenmark-Mikroumgebung geht vermutlich nicht auf eine geringere intrazelluläre Anreicherung und geringere Proteasomenhemmung in letzteren, sondern auf unterschiedliche Auswirkungen der Proteasomenhemmung in den einzelnen Zelltypen zurück. Um dies eingehender zu untersuchen, sind allerdings Kokulturmodelle oder Bioplate notwendig, da eine Untersuchung der Einzelzelltypen nur partiell die *in vivo* Situation widerspiegelt (de la Puente et al., 2015; Kirshner et al., 2008). Die enge Interaktionen auf molekularer Ebene zwischen den malignen Plasmazellen und der Knochenmark-Mikroumgebung kann Einfluss auf die Sensitivitäten gegenüber Bortezomib in Bezug auf Zellviabilität

und Aktivität der Proteasomenuntereinheiten nehmen und kann *ex vivo* nur unzureichend simuliert werden (Attar-Schneider et al., 2016; Caligaris-Cappio et al., 1991; Hideshima et al., 2007; Mitsiades et al., 2007).

Unsere Ergebnisse zeigen allerdings, dass 5 nM Bortezomib bei mehrtägiger Exposition auch gesunde Knochenzellen in ihrer Viabilität einschränken können. Zur abschließenden Bewertung dieser Ergebnisse sollten diese mit den in Maus- und Rattenmodell erhaltenen *in vivo* Daten bewertet werden.

4.3 Zusammenhang zwischen der Expression von katalytischen Proteasomenuntereinheiten und der zellulären Pharmakokinetik und Pharmakodynamik von Bortezomib in Multiplen Myelomzelllinien sowie dem ereignisfreien Überleben und Gesamtüberleben von Patienten

Eine Theorie der selektiven Wirksamkeit von Bortezomib basiert auf der unterschiedlichen Ratio zwischen *workload* und *capacity* der Proteasomen in einzelnen Zelltypen (Bianchi et al., 2009). Die *capacity* wird vorrangig durch die Anzahl der aktiven Proteasomenuntereinheiten bestimmt. Die Expressionsstärke verschiedener Proteasomenuntereinheiten korrelierte hierbei mit der antiproliferativen Wirksamkeit von Bortezomib in verschiedenen Zellen maligner B-Zell-Erkrankungen und solider Tumoren (Busse et al., 2008). Maligne Plasmazellen weisen eine bis zu 25-fach höheren Expression der Proteasomen im Vergleich zu normalen Plasmazellen auf (Lightcap et al., 2000). Außerdem wurde gezeigt, dass resistente Myelomzelllinien die C- bzw. T-like Immun-Proteasomenuntereinheiten stärker exprimieren (Busse et al., 2008). Um diese Sensitivitätsunterschiede in Abhängigkeit von der Expression der Proteasomenuntereinheiten zu verifizieren und auch in primären Multiplen Myelomzellen sowie normalen Plasmazellen, MSC und Osteoblasten zu beschreiben, wurde eine GEP der katalytisch aktiven konstitutiven und Immun-Proteasomenuntereinheiten in einer großen Patienten- und Probandenkohorte durchgeführt.

Die Ergebnisse zeigten keine signifikanten Expressionsunterschiede der konstitutiven und Immun-Proteasomenuntereinheiten in Myelomzelllinien, MSC, Osteoblasten, malignen und normalen Plasmazellen in der Kohorte. Bisherige Studien untersuchten nur die unterschiedlichen Proteasomenmengen in normalen/malignen Plasmazellen bzw. Multiplen Myelomzelllinien, jedoch nicht in derartigem Stichprobenumfang und nicht in MSC oder Osteoblasten (Bianchi et al., 2009; Busse et al., 2008; Cenci et al., 2006). Überraschenderweise exprimierten auch die nicht-malignen MSC und Osteoblasten gesunder Spender die katalytischen Untereinheiten des Immunproteasoms, die bisher nur in Zusammenhang mit INF-stimulierten bzw. in am Immunsystem beteiligten Zellen beschrieben wurden (Kniepert and Groettrup, 2014).

In den untersuchten Myelomzelllinien korrelierte die maximale intrazelluläre Anreicherung mit der Expression der C_i-like Proteasomenuntereinheit. Ein Trend für einen Zusammenhang zwischen der Expressionsstärke und der intrazellulären Bortezomibkonzentration war ebenfalls für die C- und CT_i- und T_i-like Proteasomenuntereinheiten zu erkennen. Je mehr der C-like und der drei Immun-Proteasomenuntereinheiten in den Zellen vorhanden waren, desto höher war die Bortezomibkonzentration in den Zellen. Generell wurde aufgrund der Annahme einer

diffusionsgesteuerten Aufnahme von Bortezomib (oder anderen Proteasomeninhibitoren) eine Beeinflussung der intrazellulären Aufnahme durch die Anzahl der *targets* diskutiert (Clemens et al., 2015; Schafer et al., 2017). Interessant ist, dass für die CT-like Proteasomenuntereinheit trotz höchster Bindungsaffinität von Bortezomib kein Zusammenhang zwischen Expression und intrazellulärer Konzentration festgestellt werden konnte (Gozzetti et al., 2017). Aufgrund dieser hohen Bindungsaffinität besteht allerdings nur ein geringer Spielraum für Abhängigkeiten zwischen Expressionshöhe und affinitätsbedingter Bortezomib-Akkumulation: Selbst wenn sich die CT-like Proteasomen-Expression stark verändern sollte, wirkt sich dies nicht auf eine eindeutig quantifizierbare Änderung der intrazellulären Bortezomib-Konzentration aus, da nur kleinste Bortezomib-Konzentrationen nötig sind, um die CT-like Untereinheit vollständig zu sättigen und funktionell zu hemmen (Berkers et al., 2005; Crawford et al., 2006; Ettari et al., 2016).

Für die inhibitorische Wirksamkeit am Proteasom war lediglich für die CT_i-like Proteasomenuntereinheit ein Zusammenhang zwischen niedriger IC₅₀ und damit effektiver Hemmung der Peptidspaltungs-Aktivität und niedrigen Expressionslevels festzustellen. Diese Erkenntnis entspricht den Erwartungen eines Zusammenhangs zwischen Wirksamkeit und *target*-Menge. Bei einer niedrigen Anzahl an Zielstrukturen wird weniger Bortezomib benötigt, um die Gesamtaktivität der katalytischen CT_i-like Proteasomenuntereinheit zu hemmen. Allerdings konnte bei der Durchführung des Assays zur Bestimmung der inhibitorischen Potenz an der CT-like Proteasomenuntereinheit nicht zwischen konstitutivem bzw. Immunproteasom unterschieden werden. Diese methodische Schwierigkeit könnte somit den signifikanten Zusammenhang entkräften.

In der untersuchten Patientenkohorte ergab sich ein Trend für den Zusammenhang zwischen einer niedrigen Expressionshöhe der katalytisch aktiven Proteasomenuntereinheiten und dem ereignisfreien Überleben bzw. Gesamtüberleben, der allerdings in der Validierungskohorte nicht bestätigt werden konnte. Abschließend kann demnach keine Aussage über eine Assoziation der beiden Parameter getroffen werden. Die Anzahl der Proteasomenuntereinheiten der Zellen vor Therapiebeginn hat demnach keinen Einfluss auf das ereignisfreie Überleben und Gesamtüberleben der Patienten mit Multiplem Myelom. In diesem Kontext könnte die Expressionshöhe lediglich ein Prädiktor für die Progression darstellen, jedoch nicht für das Ansprechen auf Bortezomib, da die Patienten der Kohorte mit unterschiedlichen Kombinationstherapien und nicht mit diesem Wirkstoff allein behandelt wurden.

In der vorliegenden Studie wurde zwar die relative Expressionshöhe der Proteasomenuntereinheiten bestimmt, allerdings spiegelt diese nicht wieder, wie viele der Proteasomenuntereinheiten funktional assembliert vorliegen und damit wie hoch die basale Funktion (*capacity*) der Proteasomen in den Zellen tatsächlich ist. Damit wäre selbst bei Kenntnis des *workload* eine abschließende Beurteilung nicht möglich gewesen. Es wäre daher wünschenswert Methoden zu entwickeln mit denen die funktionelle Proteasomenmenge quantitativ bestimmt werden kann. Neben der Expression oder Aktivität des eigentlichen *targets* (Proteasomenuntereinheiten), beeinflusst auch die UPR die Sensitivität gegenüber Bortezomib, da sie indirekt die Auslastung der Proteasomen (*workload*) bestimmt (Ling et al., 2012). Darüber hinaus, wäre zur Untermauerung der Hypothese, wonach das *capacity-workload*-Verhältnis die antiproliferative Wirksamkeit bestimmt, auch eine Quantifizierung der Anzahl ubiquitylierter Proteine bzw. abzubauen der Proteine (*workload*) notwendig gewesen.

Alternativ zur *workload-capacity* Theorie werden in der Literatur folgende andere molekulare Mechanismen in Bezug auf die Sensitivitätsunterschiede von Zellen gegenüber Bortezomib diskutiert (Bianchi et al., 2009; Ungar-Waron et al., 1990):

- (1) Höhere basale Aktivität von NF- κ B und damit auch Abhängigkeit der zellulären Homöostase vom NF- κ B Signalweg (Hideshima et al., 2009).
- (2) Konformationsänderungen an post-translationalen Modifikationen der Proteasomenuntereinheiten (Pitcher et al., 2015).

Diese Theorien wurden bisher allerdings nur begrenzt *in vitro* an Modellzelllinien beschrieben und es bedarf weiterer Daten, die diese Theorien vor allem *in vivo* belegen.

Zusammenfassend zeigen die Daten unserer Studie, dass Sensitivitätsunterschiede in MSC, Osteoblasten sowie Myelomzellen nicht vollständig anhand zellulärer Bortezomib-Kinetik, pharmakodynamischer Wirksamkeit oder Potenz an den Proteasomenuntereinheiten oder unterschiedlichen Expressionsmustern der *target*-Strukturen erklärt werden können.

4.4 Vergleich der zellulären Pharmakokinetik und Pharmakodynamik von Bortezomib allein und innerhalb der Kombinationstherapieregime PAd und VMP in Zelllinien des Multiplen Myeloms

Bortezomib wird in der Induktionstherapie in Kombination mit Glukokortikoiden und klassischen Zytostatika eingesetzt. Dabei zeigte sich in mehreren klinischen Studien eine überlegene Wirksamkeit der Kombinationstherapieregime gegenüber der Einzelgabe von Bortezomib (Murray et al., 2014; Raab et al., 2009). Zur Klärung, ob die synergistische Wirkverstärkung von etablierten Kombinationen auf eine pharmakokinetische oder pharmakodynamische Wechselwirkung zurückzuführen ist, wurde die zelluläre Pharmakokinetik von Bortezomib allein und innerhalb der Kombinationstherapieregime PAd und VMP bestimmt. Außerdem wurden die Kombinationseffekte bezüglich antiproliferativer Potenz und proteasomaler inhibitorischer Potenz untersucht. Die zu 5 nM Bortezomib kombinierten Konzentrationen von Dexamethason, Doxorubicin, Melphalan und Prednisolon wurden auf der Grundlage der *in vivo* eingesetzten Dosierungen und erreichten Plasmaspiegel gewählt (Mai et al., 2015; Barpe et al., 2010).

Die Wirkstoffe Dexamethason, Doxorubicin, Melphalan und Prednisolon allein zeigten in den verwendeten Konzentrationen keine Effekte auf die Viabilität der Myelomzellen. Die in der Literatur beschriebenen antiproliferativen Effekte von Dexamethason (IC_{50} = 125 nM) und Doxorubicin (IC_{50} = 150 nM) in einer Zelllinie des Multiplen Myeloms konnten demnach nicht reproduziert werden (Hideshima et al., 2001c; Mitsiades et al., 2003). Eine mögliche Ursache könnte die verkürzte Expositionszeit in unseren Versuchen darstellen.

Ebenso konnte keine Veränderung der antiproliferativen Potenz von Bortezomib in den getesteten Myelomzelllinien innerhalb der Kombination VMP für einen Expositionszeitraum von 24 h nachgewiesen werden. In den Zelllinien Karpas-620 und KMM-1 wurden überraschenderweise höhere IC_{50} -Werte für Bortezomib innerhalb des Kombinationstherapieregimes PAd ermittelt und damit eine schwächere antiproliferative Wirksamkeit. Jedoch ist aufgrund der kleinen Effektgröße davon auszugehen, dass weder die Kombination der Wirkstoffe des Therapieregimes VMP noch PAd *in vitro* Einfluss auf die antiproliferative Wirksamkeit von Bortezomib nehmen. Um dennoch mögliche synergistische Effekte am Proteasom zu ermitteln, wurde zunächst der Einfluss variierender Konzentrationen der Einzelsubstanzen der VMP- und PAd-Kombinationen auf die Aktivität der drei proteasomalen Untereinheiten getestet. Lediglich für Doxorubicin war eine Hemmung der drei Untereinheiten in sehr hohen Konzentrationen (10, 50 μ M) zu beobachten, die allerdings weit über

den in den Kombinationsversuchen verwendeten 200 nM lagen. Um eine mögliche Beeinflussung der Proteasomeninhibition durch Bortezomib über einen noch ungeklärten Mechanismus zu untersuchen, wurden die Effekte der Wirkstoffkombinationen PAd und VMP an der Wirksamkeitsbestimmenden CT-like Untereinheit untersucht. Die inhibitorische Potenz von Bortezomib an der CT-like Proteasomenuntereinheit wurde in KMM-1 Zellen innerhalb der PAd Kombination signifikant verstärkt. Ebenso wurde nach Exposition der LP-1 und RPMI-8226 Zellen mit Bortezomib innerhalb des VMP-Regimes eine effektivere Hemmung der CT-like Proteasomenaktivität gezeigt. Die Expositionszeit-abhängige Veränderung der Aktivität der Proteasomenuntereinheiten führte zu keinen signifikanten Unterschieden zwischen Bortezomib allein bzw. innerhalb der Kombinationstherapieregime PAd und VMP. Diese Ergebnisse verdeutlichen, dass es zu keiner direkten Hemmung dieser Untereinheit durch Doxorubicin, Dexamethason, Melphalan oder Prednisolon kommt. Die Wirkstoffe beeinflussen möglicherweise durch indirekte Mechanismen die Aktivität der CT-like Proteasomenuntereinheit. Als indirekte Mechanismen wären z.B. posttranslationale Modifikationen der Proteasomenuntereinheiten, die zu Konformationsänderungen führen können, oder Phosphorylierungen der katalytisch aktiven Funktionseinheiten denkbar (Pitcher et al., 2015).

Diese Daten untermauern die Theorie, dass der antiproliferative Effekt von Bortezomib in Multiplen Myelomzellen nicht allein mit dem Ausmaß der Inhibition an den Proteasomenuntereinheiten erklärt werden kann (Shabaneh et al., 2013). Der apoptotische Effekt von Bortezomib kann möglicherweise nicht nur durch die Hemmung des Proteinabbaus durch das Proteasom und die darauf folgenden zellulären Mechanismen erklärt werden, sondern wird auch durch andere bisher unbekannte pleiotrope Effekte in Myelomzellen hervorgerufen. Ebenso bleibt zu klären, ob Bortezomib die Apoptose-induzierenden Mechanismen der anderen Wirkstoffe verstärkt und damit zu einer erhöhten Sensitivität gegenüber diesen führt. Dies wurde in vorangegangenen Studien für Doxorubicin gezeigt, entsprechende Mechanismen und ob diese Interaktion auf pharmakokinetischen oder pharmakodynamischen Interaktionen beruht, wurde jedoch nicht geklärt (Hideshima et al., 2001c; Mitsiades et al., 2003).

4.5 Einfluss des Endothelin-Signalweges auf die Wirksamkeit von Bortezomib bei Kombination mit Endothelinrezeptor-Antagonisten und ET-1 gegenüber der Einzelsubstanz Bortezomib in Zelllinien des Multiplen Myeloms

Eine Beteiligung des Endothelin-Signalweges an der Entstehung und Progression verschiedener maligner Erkrankungen aber auch der Knochenhomöostase wurde bereits in der Literatur diskutiert (Clines et al., 2007; Nelson et al., 2003; Nelson et al., 1999). Zwei *in vitro* Studien zeigten eine mögliche Beteiligung von ET-1 und dessen Rezeptoren ET_A und ET_B an der Proliferation von Myelomzellen und eine mögliche synergistische Wirkung von Bortezomib mit Endothelinrezeptor-Antagonisten in diesen Zellen (Russignan et al., 2017; Vaiou et al., 2016). Beide Studien wiesen allerdings Schwächen auf: 1) Die verwendeten Bosentankonzentrationen (50 µM und 100 µM) lagen weit über den bisher *in vivo* erreichbaren Plasmaspiegeln. Bei der Therapie von Patienten mit pulmonaler arterieller Hypertonie werden in unter Standarddosierungen von 62,5 oder 125 mg im *steady state* maximale Gesamt-Plasmakonzentrationen von 2,1 µM bzw. 4,1 µM gemessen (Dingemanse and van Giersbergen, 2004). Unter Berücksichtigung der hohen Plasmaproteinbindung von 98 %, liegen nur 0,042 µM bzw. 0,082 µM Bosentan als freie Fraktion vor (Dingemanse and van

Giersbergen, 2004). 2) Toxizitäten der verwendeten Konzentrationen auf Zellen des Multiplen Myeloms wurden nicht untersucht und können somit nicht ausgeschlossen werden. 3) Die Effekte auf die Proteasomenaktivität der Kombination wurden nicht untersucht. 4) Es wurden lediglich zwei Myelomzelllinien getestet, sodass die Reproduzierbarkeit der Daten fraglich ist.

Unsere Daten belegen die Expression von ET-1 und dem ET_B-Rezeptor in Myelomzelllinien, normalen Plasmazellen und malignen Plasmazellen verschiedener Krankheitsstadien. Im Gegensatz dazu konnte der ET_A-Rezeptor nur in wenigen Myelomzelllinien und primären Myelomzellen nachgewiesen werden. Diese Daten untermauern bisherige Erkenntnisse, dass der Endothelinsignalweg in malignen und normalen Plasmazellen basal aktiv ist (Russignan et al., 2017; Vaiou et al., 2016). Ebenso wurde die variierende Expression des ET_A-Rezeptors auch in vorangegangenen Studien gezeigt und in einen möglichen Zusammenhang mit Bortezomib-resistenzen gebracht (Vaiou et al., 2016).

Die intrazelluläre Anreicherung von Bortezomib wurde in Kombination mit dem dualen Endothelinrezeptor-Antagonisten Bosentan nicht verändert. Eine Änderung der intrazellulären Pharmakokinetik von Bosentan wurde nicht bestimmt. Allerdings wäre hier eine Transporter-vermittelte Interaktion an OATP1B3 denkbar, da Bortezomib ein Inhibitor und Bosentan ein Substrat dieses Uptake-Transporters ist (Clemens et al., 2017; Treiber et al., 2007).

Die selektiven Endothelinrezeptor-Antagonisten BQ123 und BQ788 allein zeigten keinen antiproliferativen Effekt auf Multiple Myelomzelllinien, wohingegen die in der Literatur verwendeten 100 µM Bosentan die Zellviabilität in RPMI-8226 und KMM-1 Zellen um maximal ca. 40 % senkte. 100 µM Bosentan verstärkten die antiproliferative Potenz von Bortezomib in den Zelllinien LP-1 und RPMI-8226 nach 48 h Expositionszeit. Es konnte allerdings kein kombinatorischer Effekt mit BQ123, BQ788 und ET-1 auf die Reduktion der Zellviabilität durch Bortezomib festgestellt werden. Diese Daten untermauern die Annahme, dass die synergistischen Effekte von Bosentan über eine Endothelinrezeptorblockade hinausgehen. Ob Bosentan tatsächlich Effekte auf die Zellviabilität hat und evtl. auch zur Aktivitätsänderung des Proteasoms führt, wurde in der Folge untersucht. Bosentan allein senkte in drei Zelllinien die Aktivität der CT-like Untereinheit, wohingegen die C- und T-like Untereinheiten in ihrer Aktivität nicht verändert wurden. Eine Kombination aus Bortezomib und Bosentan wirkte dagegen nicht stärker inhibierend auf diese Untereinheit als Bortezomib allein. Mittels Zytotoxizitätsassay wurde ausgeschlossen, dass die Effekte auf eine Toxizität der gewählten Konzentration von Bosentan zurückzuführen sind.

Bosentan und andere Endothelinrezeptor-Antagonisten wurden als effektive Therapeutika zur verstärkten Wirksamkeit von Bortezomib in vorangegangenen *in vitro* Studien postuliert, allerdings ist die experimentelle Evidenz bisher nicht ausreichend. Unsere Ergebnisse deuten auf einen Effekt von 100 µM Bosentan in Zelllinien des Multiplen Myeloms hin, der nicht über den Endothelin-Signalweg vermittelt wird, wie z.B. eine geringe Beeinflussung der CT-like Proteasomenaktivität in hohen Konzentrationen. Allerdings konnte dieser Effekt nicht in allen Zelllinien gezeigt werden und variiert möglicherweise stark in einzelnen Zellmodellen oder auch in Patienten. Darüber hinaus lagen die effektiven Bosentankonzentrationen weit über den zu erreichenden Plasmaspiegeln und haben somit vermutlich klinische keine Relevanz. Weitere *in vitro* und präklinische *in vivo* Modelle sind notwendig, um die Mechanismen hinter den beobachteten synergistischen Effekten zu klären und den möglichen Einsatz von Endothelinrezeptor-Antagonisten in der Therapie des Multiplen Myeloms genauer zu beschreiben.

5. Konklusion und Ausblick

Die im Rahmen dieser Arbeit *in vitro* verwendete Bortezomibkonzentration von 5 nM (entsprechend der mittleren IC_{50} in Bezug auf die Zellviabilität und Inhibition der CT-like Proteasomenuntereinheit in Myelomzelllinien) führte in primären Myelomzellen, MSC und Osteoblasten zu einer unterschiedlichen intrazellulären Akkumulation. Allerdings wurde wider Erwarten keine entsprechend höhere Bortezomibkonzentration in den Myelomzellen im Vergleich zu den untersuchten Zellen der Knochenmark-Mikroumgebung gefunden. Damit konnte erstmals eindeutig geklärt werden, dass die selektive antiproliferative Wirksamkeit von Bortezomib nicht durch eine unterschiedliche zelluläre Pharmakokinetik erklärt werden kann. Kurzzeit-Expositionen (bis zu 48 h) mit dieser Bortezomibkonzentration zeigten keinen Einfluss auf die Viabilität von MSC und Osteoblasten, wohingegen nach 5 Tagen Expositionszeit in 3 von 5 getesteten MSC von Spender bzw. Patienten diese potent durch Bortezomib in ihrer Viabilität reduziert wurden. Die katalytischen Proteasomenuntereinheiten wurden durch Bortezomib in allen untersuchten Zelltypen mit ähnlicher Potenz inhibiert. Auch in MSC und Osteoblasten wurde die CT-like Proteasomenuntereinheit am effektivsten in ihrer Aktivität gehemmt und es trat eine charakteristische kompensatorische Gegenregulation der T-like Proteasomenuntereinheit auf. Diese Erkenntnisse zeigen, dass die antiproliferative Wirksamkeit nicht zwangsläufig mit der Proteasomenhemmung korreliert. Wie bereits beschrieben könnte die Proteasomenhemmung in Zelltypen nicht-malignen Ursprungs auch nicht zu proapoptotisch wirksamen Mechanismen, wie der verstärkten Differenzierung von MSC zu Osteoblasten führen. Für die zelluläre Pharmakokinetik, Reduktion der Viabilität und Inhibition der Proteasomenuntereinheiten war kein Unterschied zwischen den MSC bzw. Osteoblasten von gesunden Probanden bzw. Patienten mit Multiplem Myelom zu erkennen.

Zusammengefasst kann eine kurze lokale Freisetzung von 5 nM Bortezomib bis hin zu 48 h eine selektive antiproliferative Wirkung auf Zellen des Multiplen Myeloms ausüben. Bei einer konstanten Freisetzungsrate dieser Konzentration sind allerdings bereits ab 5 Tagen Expositionszeit Viabilitäseinsparungen bei MSC zu erwarten.

In diesem Zusammenhang gilt es zukünftig zu prüfen, bis zu welcher Expositionszeit mit keiner Reduktion der Zellviabilität in MSC zu rechnen ist bzw. welche Faktoren diese Sensitivität gegenüber geringen Bortezomibkonzentrationen beeinflussen. Ebenfalls sollte gezeigt werden, ob dieser Effekt auch für ausdifferenzierte Osteoblasten zu beobachten ist. Zudem bleibt ungeklärt, welche Auswirkungen eine solche MSC-Viabilitätsreduktion auf die Knochenmark-Mikroumgebung *in vivo* hat. Ein weiterer Beitrag zur Wirksamkeit und Sicherheit des Bortezomib-freisetzenden Knochenersatzmaterials würde eine Konzentrations- und zeitabhängige Beobachtung der Differenzierung von MSC zu Osteoblasten und damit dem osteoanabolen Effekt leisten. Für eine bessere Simulation der *in vivo* Situation könnten für weitere Experimente auch Kokulturmodelle oder tierexperimentelle Studien zur Aufklärung des Einflusses der Knochen-/Knochenmark-Mikroumgebung Einsatz finden.

Weiterhin konnte in der vorliegenden Arbeit kein Zusammenhang zwischen Expressionshöhe der katalytischen Proteasomenuntereinheiten in malignen und normalen Plasmazellen, sowie Zellen der Knochenmark-Mikroumgebung und der selektiven antiproliferativen Wirkung von Bortezomib gezeigt werden. Um die Selektivität von Bortezomib anhand der unterschiedlichen *workload/capacity* Ratio eingehend zu untersuchen, wäre die Bestimmung der Menge der zum proteasomalen Abbau mit Ubiquitin markierten Proteine essentiell. Die Expressionsstärken der CT-, T-, C-, CT_i-, T_i und C_i-like Untereinheiten stellen auch keinen prognostischen Marker in Bezug auf das ereignisfreie Überleben

oder Gesamtüberleben dar. Die Korrelation der Expressionsrate mit dem Ansprechen unter Bortezomibtherapie wäre in diesem Zusammenhang interessant, aber in der Praxis wird dies durch die Beeinflussung der Wirkstoffe innerhalb der Kombinationstherapieregime erschwert. Die mechanistische Grundlage für die selektive Wirksamkeit auf maligne Plasmazellen konnte in dieser Arbeit nicht eruiert werden und Bedarf weiterer experimenteller Aufklärung.

Die *in vivo* beschriebene bessere Ansprechrate von Bortezomib innerhalb von Kombinationstherapieregimen, wie PAd und VMP, konnte nicht auf eine veränderte zelluläre Pharmakokinetik, Potenzierung der Viabilitätsreduktion oder Proteasomeninhibition von Bortezomib in Myelomzelllinien zurückgeführt werden. Eine Kombination mit dem dualen Endothelinrezeptor-Antagonisten Bosentan führte nicht zu einer veränderten zellulären Pharmakokinetik oder Pharmakodynamik von Bortezomib.

Insgesamt lässt sich festhalten, dass das Ausmaß der intrazellulären Akkumulation von Bortezomib keinen Einfluss auf dessen Wirksamkeit ausübt.

6. Literaturverzeichnis

Abdi, J., Jian, H., and Chang, H. (2016). Role of micro-RNAs in drug resistance of multiple myeloma. *Oncotarget* 7, 60723-60735.

Abraham, J., Salama, N.N., and Azab, A.K. (2015). The role of P-glycoprotein in drug resistance in multiple myeloma. *Leukemia & lymphoma* 56, 26-33.

Abramson, H.N. (2018). Monoclonal Antibodies for the Treatment of Multiple Myeloma: An Update. *Int J Mol Sci* 19.

Accardi, F., Toscani, D., Bolzoni, M., Dalla Palma, B., Aversa, F., and Giuliani, N. (2015). Mechanism of Action of Bortezomib and the New Proteasome Inhibitors on Myeloma Cells and the Bone Microenvironment: Impact on Myeloma-Induced Alterations of Bone Remodeling. *BioMed research international* 2015, 172458.

Adams, J., Behnke, M., Chen, S., Cruickshank, A.A., Dick, L.R., Grenier, L., Klunder, J.M., Ma, Y.T., Plamondon, L., and Stein, R.L. (1998). Potent and selective inhibitors of the proteasome: dipeptidyl boronic acids. *Bioorganic & medicinal chemistry letters* 8, 333-338.

Adams, J., Palombella, V.J., Sausville, E.A., Johnson, J., Destree, A., Lazarus, D.D., Maas, J., Pien, C.S., Prakash, S., and Elliott, P.J. (1999). Proteasome inhibitors: a novel class of potent and effective antitumor agents. *Cancer research* 59, 2615-2622.

Adomako, A., Calvo, V., Biran, N., Osman, K., Chari, A., Paton, J.C., Paton, A.W., Moore, K., Schewe, D.M., and Aguirre-Ghiso, J.A. (2015). Identification of markers that functionally define a quiescent multiple myeloma cell sub-population surviving bortezomib treatment. *BMC cancer* 15, 444.

Aghajanian, C., Soignet, S., Dizon, D.S., Pien, C.S., Adams, J., Elliott, P.J., Sabbatini, P., Miller, V., Hensley, M.L., Pezzulli, S., *et al.* (2002). A phase I trial of the novel proteasome inhibitor PS341 in advanced solid tumor malignancies. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* 8, 2505-2511.

Aguilar, S., Nye, E., Chan, J., Loebinger, M., Spencer-Dene, B., Fisk, N., Stamp, G., Bonnet, D., and Janes, S.M. (2007). Murine but not human mesenchymal stem cells generate osteosarcoma-like lesions in the lung. *Stem cells* 25, 1586-1594.

Alaterre, E., Raimbault, S., Goldschmidt, H., Bouhya, S., Requirand, G., Robert, N., Boireau, S., Seckinger, A., Hose, D., Klein, B., *et al.* (2017). CD24, CD27, CD36 and CD302 gene expression for outcome prediction in patients with multiple myeloma. *Oncotarget* 8, 98931-98944.

Andre, P., Cisternino, S., Chiadmi, F., Toledano, A., Schlatter, J., Fain, O., and Fontan, J.E. (2005). Stability of bortezomib 1-mg/mL solution in plastic syringe and glass vial. *The Annals of pharmacotherapy* 39, 1462-1466.

Arastu-Kapur, S., Anderl, J.L., Kraus, M., Parlati, F., Shenk, K.D., Lee, S.J., Muchamuel, T., Bennett, M.K., Driessen, C., Ball, A.J., *et al.* (2011). Nonproteasomal targets of the proteasome inhibitors bortezomib and carfilzomib: a link to clinical adverse events. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* 17, 2734-2743.

Ardley, H.C., and Robinson, P.A. (2005). E3 ubiquitin ligases. *Essays Biochem* 41, 15-30.

- Arendt, C.S., and Hochstrasser, M. (1997). Identification of the yeast 20S proteasome catalytic centers and subunit interactions required for active-site formation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 94, 7156-7161.
- Arnulf, B., Lecourt, S., Soulier, J., Ternaux, B., Lacassagne, M.N., Crinquette, A., Dessoly, J., Sciaini, A.K., Benbunan, M., Chomienne, C., *et al.* (2007). Phenotypic and functional characterization of bone marrow mesenchymal stem cells derived from patients with multiple myeloma. *Leukemia* 21, 158-163.
- Attal, M., Lauwers-Cances, V., Hulin, C., Leleu, X., Caillot, D., Escoffre, M., Arnulf, B., Macro, M., Belhadj, K., Garderet, L., *et al.* (2017). Lenalidomide, Bortezomib, and Dexamethasone with Transplantation for Myeloma. *The New England journal of medicine* 376, 1311-1320.
- Attar-Schneider, O., Zismanov, V., Dabbah, M., Tartakover-Matalon, S., Drucker, L., and Lishner, M. (2016). Multiple myeloma and bone marrow mesenchymal stem cells' crosstalk: Effect on translation initiation. *Molecular carcinogenesis* 55, 1343-1354.
- Bagnato, A., and Spinella, F. (2003). Emerging role of endothelin-1 in tumor angiogenesis. *Trends in endocrinology and metabolism: TEM* 14, 44-50.
- Baksh, D., Yao, R., and Tuan, R.S. (2007). Comparison of proliferative and multilineage differentiation potential of human mesenchymal stem cells derived from umbilical cord and bone marrow. *Stem cells* 25, 1384-1392.
- Banerjee, S., Hussain, M., Wang, Z., Saliganan, A., Che, M., Bonfil, D., Cher, M., and Sarkar, F.H. (2007). In vitro and in vivo molecular evidence for better therapeutic efficacy of ABT-627 and taxotere combination in prostate cancer. *Cancer research* 67, 3818-3826.
- Barlogie, B., Mitchell, A., van Rhee, F., Epstein, J., Morgan, G.J., and Crowley, J. (2014). Curing myeloma at last: defining criteria and providing the evidence. *Blood* 124, 3043-3051.
- Barlogie, B., Tricot, G., Rasmussen, E., Anaissie, E., van Rhee, F., Zangari, M., Fassas, A., Hollmig, K., Pineda-Roman, M., Shaughnessy, J., *et al.* (2006). Total therapy 2 without thalidomide in comparison with total therapy 1: role of intensified induction and posttransplantation consolidation therapies. *Blood* 107, 2633-2638.
- Barpe, D.R., Rosa, D.D., and Froehlich, P.E. (2010). Pharmacokinetic evaluation of doxorubicin plasma levels in normal and overweight patients with breast cancer and simulation of dose adjustment by different indexes of body mass. *European journal of pharmaceutical sciences : official journal of the European Federation for Pharmaceutical Sciences* 41, 458-463.
- Barrio, S., Stuhmer, T., Da-Via, M., Barrio-Garcia, C., Lehnert, N., Besse, A., Cuenca, I., Garitano-Trojaola, A., Fink, S., Leich, E., *et al.* (2018). Spectrum and functional validation of PSMB5 mutations in multiple myeloma. *Leukemia*.
- Bartmann, C., Rohde, E., Schallmoser, K., Purstner, P., Lanzer, G., Linkesch, W., and Strunk, D. (2007). Two steps to functional mesenchymal stromal cells for clinical application. *Transfusion* 47, 1426-1435.
- Baumeister, W., Walz, J., Zuhl, F., and Seemuller, E. (1998). The proteasome: paradigm of a self-compartmentalizing protease. *Cell* 92, 367-380.

- Berger, Y., Bernasconi, C.C., and Juillerat-Jeanneret, L. (2006). Targeting the endothelin axis in human melanoma: combination of endothelin receptor antagonism and alkylating agents. *Experimental biology and medicine* 231, 1111-1119.
- Berkers, C.R., Verdoes, M., Lichtman, E., Fiebiger, E., Kessler, B.M., Anderson, K.C., Ploegh, H.L., Ovaa, H., and Galardy, P.J. (2005). Activity probe for in vivo profiling of the specificity of proteasome inhibitor bortezomib. *Nat Methods* 2, 357-362.
- Besche, H.C., Sha, Z., Kukushkin, N.V., Peth, A., Hock, E.M., Kim, W., Gygi, S., Gutierrez, J.A., Liao, H., Dick, L., *et al.* (2014). Autoubiquitination of the 26S proteasome on Rpn13 regulates breakdown of ubiquitin conjugates. *The EMBO journal* 33, 1159-1176.
- Bianchi, G., Oliva, L., Cascio, P., Pengo, N., Fontana, F., Cerruti, F., Orsi, A., Pasqualetto, E., Mezghrani, A., Calbi, V., *et al.* (2009). The proteasome load versus capacity balance determines apoptotic sensitivity of multiple myeloma cells to proteasome inhibition. *Blood* 113, 3040-3049.
- Bianco, P. (2014). "Mesenchymal" stem cells. *Annu Rev Cell Dev Biol* 30, 677-704.
- Bolli, N., Biancon, G., Moarii, M., Gimondi, S., Li, Y., de Philippis, C., Maura, F., Sathiseelan, V., Tai, Y.T., Mudie, L., *et al.* (2017). Analysis of the genomic landscape of multiple myeloma highlights novel prognostic markers and disease subgroups. *Leukemia*.
- Bonewald, L.F. (2011). The amazing osteocyte. *Journal of bone and mineral research : the official journal of the American Society for Bone and Mineral Research* 26, 229-238.
- Bose, S., Stratford, F.L., Broadfoot, K.I., Mason, G.G., and Rivett, A.J. (2004). Phosphorylation of 20S proteasome alpha subunit C8 (alpha7) stabilizes the 26S proteasome and plays a role in the regulation of proteasome complexes by gamma-interferon. *The Biochemical journal* 378, 177-184.
- Boyaci, E., Rodriguez-Lafuente, A., Gorynski, K., Mirnaghi, F., Souza-Silva, E.A., Hein, D., and Pawliszyn, J. (2015). Sample preparation with solid phase microextraction and exhaustive extraction approaches: Comparison for challenging cases. *Analytica chimica acta* 873, 14-30.
- Brewer, J.W., Hendershot, L.M., Sherr, C.J., and Diehl, J.A. (1999). Mammalian unfolded protein response inhibits cyclin D1 translation and cell-cycle progression. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 96, 8505-8510.
- Britton, M., Lucas, M.M., Downey, S.L., Screen, M., Pletnev, A.A., Verdoes, M., Tokhunts, R.A., Amir, O., Goddard, A.L., Pelphrey, P.M., *et al.* (2009). Selective inhibitor of proteasome's caspase-like sites sensitizes cells to specific inhibition of chymotrypsin-like sites. *Chemistry & biology* 16, 1278-1289.
- Busse, A., Kraus, M., Na, I.K., Rietz, A., Scheibenbogen, C., Driessen, C., Blau, I.W., Thiel, E., and Keilholz, U. (2008). Sensitivity of tumor cells to proteasome inhibitors is associated with expression levels and composition of proteasome subunits. *Cancer* 112, 659-670.
- Caligaris-Cappio, F., Bergui, L., Gregoret, M.G., Gaidano, G., Gaboli, M., Schena, M., Zallone, A.Z., and Marchisio, P.C. (1991). 'Role of bone marrow stromal cells in the growth of human multiple myeloma. *Blood* 77, 2688-2693.
- Caplan, A.L., and Bruder, S.P. (2001). Mesenchymal stem cells: building blocks for molecular medicine in the 21st century. *Trends Mol Med* 7, 259-264.
- Carducci, M.A., Saad, F., Abrahamsson, P.A., Dearnaley, D.P., Schulman, C.C., North, S.A., Sleep, D.J., Isaacson, J.D., Nelson, J.B., and Atrasentan Phase, I.I.I.S.G.I. (2007). A phase 3 randomized controlled

trial of the efficacy and safety of atrasentan in men with metastatic hormone-refractory prostate cancer. *Cancer* 110, 1959-1966.

Catley, L., Weisberg, E., Kiziltepe, T., Tai, Y.T., Hideshima, T., Neri, P., Tassone, P., Atadja, P., Chauhan, D., Munshi, N.C., *et al.* (2006). Aggresome induction by proteasome inhibitor bortezomib and alpha-tubulin hyperacetylation by tubulin deacetylase (TDAC) inhibitor LBH589 are synergistic in myeloma cells. *Blood* 108, 3441-3449.

Cavaletti, G., and Jakubowiak, A.J. (2010). Peripheral neuropathy during bortezomib treatment of multiple myeloma: a review of recent studies. *Leukemia & lymphoma* 51, 1178-1187.

Cenci, S., Mezghrani, A., Cascio, P., Bianchi, G., Cerruti, F., Fra, A., Lelouard, H., Masciarelli, S., Mattioli, L., Oliva, L., *et al.* (2006). Progressively impaired proteasomal capacity during terminal plasma cell differentiation. *The EMBO journal* 25, 1104-1113.

Chapman, M.A., Lawrence, M.S., Keats, J.J., Cibulskis, K., Sougnez, C., Schinzel, A.C., Harview, C.L., Brunet, J.P., Ahmann, G.J., Adli, M., *et al.* (2011). Initial genome sequencing and analysis of multiple myeloma. *Nature* 471, 467-472.

Chauhan, D., Hideshima, T., and Anderson, K.C. (2003). Apoptotic signaling in multiple myeloma: therapeutic implications. *International journal of hematology* 78, 114-120.

Chauhan, D., Hideshima, T., Mitsiades, C., Richardson, P., and Anderson, K.C. (2005). Proteasome inhibitor therapy in multiple myeloma. *Molecular cancer therapeutics* 4, 686-692.

Chauhan, D., Uchiyama, H., Akbarali, Y., Urashima, M., Yamamoto, K., Libermann, T.A., and Anderson, K.C. (1996). Multiple myeloma cell adhesion-induced interleukin-6 expression in bone marrow stromal cells involves activation of NF-kappa B. *Blood* 87, 1104-1112.

Chen, D., Zhao, M., and Mundy, G.R. (2004). Bone morphogenetic proteins. *Growth Factors* 22, 233-241.

Chen, P., and Hochstrasser, M. (1996). Autocatalytic subunit processing couples active site formation in the 20S proteasome to completion of assembly. *Cell* 86, 961-972.

Chen, S., Blank, J.L., Peters, T., Liu, X.J., Rappoli, D.M., Pickard, M.D., Menon, S., Yu, J., Driscoll, D.L., Lingaraj, T., *et al.* (2010). Genome-wide siRNA screen for modulators of cell death induced by proteasome inhibitor bortezomib. *Cancer research* 70, 4318-4326.

Chilosi, M., Adami, F., Lestani, M., Montagna, L., Cimarosto, L., Semenzato, G., Pizzolo, G., and Menestrina, F. (1999). CD138/syndecan-1: a useful immunohistochemical marker of normal and neoplastic plasma cells on routine trephine bone marrow biopsies. *Modern pathology : an official journal of the United States and Canadian Academy of Pathology, Inc* 12, 1101-1106.

Chinault, S.L., and Blumer, K.J. (2003). The C-terminal tail preceding the CAAX box of a yeast G protein gamma subunit is dispensable for receptor-mediated G protein activation in vivo. *The Journal of biological chemistry* 278, 20638-20644.

Chiron, D., Maiga, S., Surget, S., Descamps, G., Gomez-Bougie, P., Traore, S., Robillard, N., Moreau, P., Le Gouill, S., Bataille, R., *et al.* (2013). Autocrine insulin-like growth factor 1 and stem cell factor but not interleukin 6 support self-renewal of human myeloma cells. *Blood cancer journal* 3, e120.

Ciechanover, A. (1994). The ubiquitin-proteasome proteolytic pathway. *Cell* 79, 13-21.

Clark G. (1981). *Staining Procedures*. Williams and Wilkins, Baltimore, MD, pp 187.

- Clemens, J., Longo, M., Seckinger, A., Hose, D., Haefeli, W.E., Weiss, J., and Burhenne, J. (2014). Stability of the proteasome inhibitor bortezomib in cell based assays determined by ultra-high performance liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry. *Journal of chromatography A* 1345, 128-138.
- Clemens, J., Seckinger, A., Hose, D., Theile, D., Longo, M., Haefeli, W.E., Burhenne, J., and Weiss, J. (2015). Cellular uptake kinetics of bortezomib in relation to efficacy in myeloma cells and the influence of drug transporters. *Cancer chemotherapy and pharmacology* 75, 281-291.
- Clemens, J., Welti, L., Schafer, J., Seckinger, A., Burhenne, J., Theile, D., and Weiss, J. (2017). Bortezomib, carfilzomib and ixazomib do not mediate relevant transporter-based drug-drug interactions. *Oncology letters* 14, 3185-3192.
- Clines, G.A., Mohammad, K.S., Bao, Y., Stephens, O.W., Suva, L.J., Shaughnessy, J.D., Jr., Fox, J.W., Chirgwin, J.M., and Guise, T.A. (2007). Dickkopf homolog 1 mediates endothelin-1-stimulated new bone formation. *Mol Endocrinol* 21, 486-498.
- Collins, G.A., and Goldberg, A.L. (2017). The Logic of the 26S Proteasome. *Cell* 169, 792-806.
- Colter, D.C., Class, R., DiGirolamo, C.M., and Prockop, D.J. (2000). Rapid expansion of recycling stem cells in cultures of plastic-adherent cells from human bone marrow. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 97, 3213-3218.
- Colucci, S., Brunetti, G., Oranger, A., Mori, G., Sardone, F., Specchia, G., Rinaldi, E., Curci, P., Liso, V., Passeri, G., *et al.* (2011). Myeloma cells suppress osteoblasts through sclerostin secretion. *Blood cancer journal* 1, e27.
- Colucci, S., Brunetti, G., Rizzi, R., Zonno, A., Mori, G., Colaianni, G., Del Prete, D., Faccio, R., Liso, A., Capalbo, S., *et al.* (2004). T cells support osteoclastogenesis in an in vitro model derived from human multiple myeloma bone disease: the role of the OPG/TRAIL interaction. *Blood* 104, 3722-3730.
- Cook, N., Brais, R., Qian, W., Hak, C.C., and Corrie, P.G. (2015). Endothelin-1 and endothelin B receptor expression in pancreatic adenocarcinoma. *Journal of clinical pathology* 68, 309-313.
- Corre, J., Mahtouk, K., Attal, M., Gadelorge, M., Huynh, A., Fleury-Cappellesso, S., Danho, C., Laharrague, P., Klein, B., Reme, T., *et al.* (2007). Bone marrow mesenchymal stem cells are abnormal in multiple myeloma. *Leukemia* 21, 1079-1088.
- Costello, C. (2017). An update on the role of daratumumab in the treatment of multiple myeloma. *Therapeutic advances in hematology* 8, 28-37.
- Coux, O., Tanaka, K., and Goldberg, A.L. (1996). Structure and functions of the 20S and 26S proteasomes. *Annual review of biochemistry* 65, 801-847.
- Crane, J.L., and Cao, X. (2014). Bone marrow mesenchymal stem cells and TGF-beta signaling in bone remodeling. *The Journal of clinical investigation* 124, 466-472.
- Crawford, L.J., Walker, B., Ovaa, H., Chauhan, D., Anderson, K.C., Morris, T.C., and Irvine, A.E. (2006). Comparative selectivity and specificity of the proteasome inhibitors BzLLCCHO, PS-341, and MG-132. *Cancer research* 66, 6379-6386.
- Czock, D., Keller, F., Rasche, F.M., and Haussler, U. (2005). Pharmacokinetics and pharmacodynamics of systemically administered glucocorticoids. *Clinical pharmacokinetics* 44, 61-98.

- Damiano, J.S., Cress, A.E., Hazlehurst, L.A., Shtil, A.A., and Dalton, W.S. (1999). Cell adhesion mediated drug resistance (CAM-DR): role of integrins and resistance to apoptosis in human myeloma cell lines. *Blood* 93, 1658-1667.
- Davis, J.E., McDonald, J.M., and Jarett, L. (1978). A high-performance liquid chromatography method for hemoglobin A1c. *Diabetes* 27, 102-107.
- De Bruyne, E., Bos, T.J., Schuit, F., Van Valckenborgh, E., Menu, E., Thorrez, L., Atadja, P., Jernberg-Wiklund, H., and Vanderkerken, K. (2010). IGF-1 suppresses Bim expression in multiple myeloma via epigenetic and posttranslational mechanisms. *Blood* 115, 2430-2440.
- de la Puente, P., Muz, B., Gilson, R.C., Azab, F., Luderer, M., King, J., Achilefu, S., Vij, R., and Azab, A.K. (2015). 3D tissue-engineered bone marrow as a novel model to study pathophysiology and drug resistance in multiple myeloma. *Biomaterials* 73, 70-84.
- Decker, T., and Lohmann-Matthes, M.L. (1988). A quick and simple method for the quantitation of lactate dehydrogenase release in measurements of cellular cytotoxicity and tumor necrosis factor (TNF) activity. *Journal of immunological methods* 115, 61-69.
- Delforge, M., Blade, J., Dimopoulos, M.A., Facon, T., Kropff, M., Ludwig, H., Palumbo, A., Van Damme, P., San-Miguel, J.F., and Sonneveld, P. (2010). Treatment-related peripheral neuropathy in multiple myeloma: the challenge continues. *The Lancet Oncology* 11, 1086-1095.
- Delforge, M., Terpos, E., Richardson, P.G., Shpilberg, O., Khuageva, N.K., Schlag, R., Dimopoulos, M.A., Kropff, M., Spicka, I., Petrucci, M.T., *et al.* (2011). Fewer bone disease events, improvement in bone remodeling, and evidence of bone healing with bortezomib plus melphalan-prednisone vs. melphalan-prednisone in the phase III VISTA trial in multiple myeloma. *European journal of haematology* 86, 372-384.
- Demunter, A., De Wolf-Peeters, C., Degreef, H., Stas, M., and van den Oord, J.J. (2001). Expression of the endothelin-B receptor in pigment cell lesions of the skin. Evidence for its role as tumor progression marker in malignant melanoma. *Virchows Arch* 438, 485-491.
- Denlinger, C.S., Meropol, N.J., Li, T., Lewis, N.L., Engstrom, P.F., Weiner, L.M., Cheng, J.D., Alpaugh, R.K., Cooper, H., Wright, J.J., *et al.* (2014). A phase II trial of the proteasome inhibitor bortezomib in patients with advanced biliary tract cancers. *Clin Colorectal Cancer* 13, 81-86.
- Dettmer, S., Theile, D., Schafer, J., Seckinger, A., Burhenne, J., and Weiss, J. (2016). Proteasome inhibition correlates with intracellular bortezomib concentrations but not with antiproliferative effects after bolus treatment in myeloma cell lines. *Naunyn-Schmiedeberg's archives of pharmacology* 389, 1091-1101.
- Dettmer, S., Theile, D., Seckinger, A., Burhenne, J., and Weiss, J. (2015). Fetal calf sera can distort cell-based luminescent proteasome assays through heat-resistant chymotrypsin-like activity. *Analytical biochemistry* 471, 23-25.
- Dhodapkar, M.V., Abe, E., Theus, A., Lacy, M., Langford, J.K., Barlogie, B., and Sanderson, R.D. (1998). Syndecan-1 is a multifunctional regulator of myeloma pathobiology: control of tumor cell survival, growth, and bone cell differentiation. *Blood* 91, 2679-2688.
- Diehl, V., Schaadt, M., Kirchner, H., Hellriegel, K.P., Gudat, F., Fonatsch, C., Laskewitz, E., and Guggenheim, R. (1978). Long-term cultivation of plasma cell leukemia cells and autologous lymphoblasts (LCL) in vitro: a comparative study. *Blut* 36, 331-338.

- Digirolamo, C.M., Stokes, D., Colter, D., Phinney, D.G., Class, R., and Prockop, D.J. (1999). Propagation and senescence of human marrow stromal cells in culture: a simple colony-forming assay identifies samples with the greatest potential to propagate and differentiate. *British journal of haematology* 107, 275-281.
- Dimarakis, I., and Levicar, N. (2006). Cell culture medium composition and translational adult bone marrow-derived stem cell research. *Stem cells* 24, 1407-1408.
- Dimopoulos, M.A., Mateos, M.V., Richardson, P.G., Schlag, R., Khuageva, N.K., Shpilberg, O., Kropff, M., Spicka, I., Palumbo, A., Wu, K.L., *et al.* (2011). Risk factors for, and reversibility of, peripheral neuropathy associated with bortezomib-melphalan-prednisone in newly diagnosed patients with multiple myeloma: subanalysis of the phase 3 VISTA study. *European journal of haematology* 86, 23-31.
- Dimopoulos, M.A., Richardson, P.G., Moreau, P., and Anderson, K.C. (2015). Current treatment landscape for relapsed and/or refractory multiple myeloma. *Nature reviews Clinical oncology* 12, 42-54.
- Dingemans, J., and van Giersbergen, P.L. (2004). Clinical pharmacology of bosentan, a dual endothelin receptor antagonist. *Clinical pharmacokinetics* 43, 1089-1115.
- Dominici, M., Le Blanc, K., Mueller, I., Slaper-Cortenbach, I., Marini, F., Krause, D., Deans, R., Keating, A., Prockop, D., and Horwitz, E. (2006). Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy* 8, 315-317.
- Donckier, J.E., Mertens-Strijthagen, J., and Flamion, B. (2007). Role of the endothelin axis in the proliferation of human thyroid cancer cells. *Clinical endocrinology* 67, 552-556.
- Dou, Q.P., McGuire, T.F., Peng, Y., and An, B. (1999). Proteasome inhibition leads to significant reduction of Bcr-Abl expression and subsequent induction of apoptosis in K562 human chronic myelogenous leukemia cells. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics* 289, 781-790.
- Driscoll, J., and Goldberg, A.L. (1990). The proteasome (multicatalytic protease) is a component of the 1500-kDa proteolytic complex which degrades ubiquitin-conjugated proteins. *The Journal of biological chemistry* 265, 4789-4792.
- Dupuis, M.M., and Tuchman, S.A. (2016). Non-secretory multiple myeloma: from biology to clinical management. *OncoTargets and therapy* 9, 7583-7590.
- Eastman, A. (2017). Improving anticancer drug development begins with cell culture: misinformation perpetrated by the misuse of cytotoxicity assays. *Oncotarget* 8, 8854-8866.
- Egan, J.B., Shi, C.X., Tembe, W., Christoforides, A., Kurdoglu, A., Sinari, S., Middha, S., Asmann, Y., Schmidt, J., Braggio, E., *et al.* (2012). Whole-genome sequencing of multiple myeloma from diagnosis to plasma cell leukemia reveals genomic initiating events, evolution, and clonal tides. *Blood* 120, 1060-1066.
- Egidy, G., Juillerat-Jeanneret, L., Jeannin, J.F., Korth, P., Bosman, F.T., and Pinet, F. (2000). Modulation of human colon tumor-stromal interactions by the endothelin system. *The American journal of pathology* 157, 1863-1874.

- Einsele, H., Engelhardt, M., Tapprich, C., Muller, J., Liebisch, P., Langer, C., Kropff, M., Mugge, L.O., Jung, W., Wolf, H.H., *et al.* (2017). Phase II study of bortezomib, cyclophosphamide and dexamethasone as induction therapy in multiple myeloma: DSMM XI trial. *British journal of haematology* 179, 586-597.
- Eltze, E., Bertolin, M., Korsching, E., Wulfig, P., Maggino, T., and Lelle, R. (2007). Expression and prognostic relevance of endothelin-B receptor in vulvar cancer. *Oncology reports* 18, 305-311.
- EMA Guideline on Bioanalytical Method Validation, 2011.
- EMA Assessment Report Neofordex, 2014 URL: https://www.ema.europa.eu/documents/assessment-report/neofordex-epar-public-assessment-report_en.pdf, Aufgerufen am 13.11.2018, 17.20 Uhr.
- Ettari, R., Previti, S., Bitto, A., Grasso, S., and Zappala, M. (2016). Immunoproteasome-Selective Inhibitors: A Promising Strategy to Treat Hematologic Malignancies, Autoimmune and Inflammatory Diseases. *Current medicinal chemistry* 23, 1217-1238.
- Facon, T., Dimopoulos, M.A., Dispenzieri, A., Catalano, J.V., Belch, A., Cavo, M., Pinto, A., Weisel, K., Ludwig, H., Bahlis, N.J., *et al.* (2018). Final analysis of survival outcomes in the phase 3 FIRST trial of up-front treatment for multiple myeloma. *Blood* 131, 301-310.
- Facon, T., Mary, J.Y., Hulin, C., Benboubker, L., Attal, M., Pegourie, B., Renaud, M., Harousseau, J.L., Guillermin, G., Chaletteix, C., *et al.* (2007). Melphalan and prednisone plus thalidomide versus melphalan and prednisone alone or reduced-intensity autologous stem cell transplantation in elderly patients with multiple myeloma (IFM 99-06): a randomised trial. *Lancet* 370, 1209-1218.
- Fattinger, K., Funk, C., Pantze, M., Weber, C., Reichen, J., Stieger, B., and Meier, P.J. (2001). The endothelin antagonist bosentan inhibits the canalicular bile salt export pump: a potential mechanism for hepatic adverse reactions. *Clinical pharmacology and therapeutics* 69, 223-231.
- FDA Guidance for Industry: Bioanalytical Method Validation, 2018, Seite 4-19.
- Ferrington, D.A., and Gregerson, D.S. (2012). Immunoproteasomes: structure, function, and antigen presentation. *Progress in molecular biology and translational science* 109, 75-112.
- Fleming T.R., Harrington D.P. (1984). Nonparametric estimation of the survival distribution in censored data. *Comma in Stat Theory and Methods* 13(20); 2469-2486.
- Franke, N.E., Niewerth, D., Assaraf, Y.G., van Meerloo, J., Vojtekova, K., van Zantwijk, C.H., Zweegman, S., Chan, E.T., Kirk, C.J., Geerke, D.P., *et al.* (2012). Impaired bortezomib binding to mutant beta5 subunit of the proteasome is the underlying basis for bortezomib resistance in leukemia cells. *Leukemia* 26, 757-768.
- Frey, B.M., and Frey, F.J. (1990). Clinical pharmacokinetics of prednisone and prednisolone. *Clinical pharmacokinetics* 19, 126-146.
- Friedenstein, A.J., Piatetzky, S., II, and Petrakova, K.V. (1966). Osteogenesis in transplants of bone marrow cells. *J Embryol Exp Morphol* 16, 381-390.
- Fuhler, G.M., Baanstra, M., Chesik, D., Somasundaram, R., Seckinger, A., Hose, D., Peppelenbosch, M.P., and Bos, N.A. (2010). Bone marrow stromal cell interaction reduces syndecan-1 expression and induces kinomic changes in myeloma cells. *Experimental cell research* 316, 1816-1828.

- Fulciniti, M., Hideshima, T., Vermot-Desroches, C., Pozzi, S., Nanjappa, P., Shen, Z., Patel, N., Smith, E.S., Wang, W., Prabhala, R., *et al.* (2009). A high-affinity fully human anti-IL-6 mAb, 1339, for the treatment of multiple myeloma. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* 15, 7144-7152.
- Funaro, A., and Malavasi, F. (1999). Human CD38, a surface receptor, an enzyme, an adhesion molecule and not a simple marker. *Journal of biological regulators and homeostatic agents* 13, 54-61.
- Gallerani, E., Zucchetti, M., Brunelli, D., Marangon, E., Noberasco, C., Hess, D., Delmonte, A., Martinelli, G., Bohm, S., Driessen, C., *et al.* (2013). A first in human phase I study of the proteasome inhibitor CEP-18770 in patients with advanced solid tumours and multiple myeloma. *European journal of cancer* 49, 290-296.
- Gandolfi, S., Laubach, J.P., Hideshima, T., Chauhan, D., Anderson, K.C., and Richardson, P.G. (2017). The proteasome and proteasome inhibitors in multiple myeloma. *Cancer metastasis reviews* 36, 561-584.
- Gangemi, S., Allegra, A., Alonci, A., Cristani, M., Russo, S., Speciale, A., Penna, G., Spatari, G., Cannavo, A., Bellomo, G., *et al.* (2012). Increase of novel biomarkers for oxidative stress in patients with plasma cell disorders and in multiple myeloma patients with bone lesions. *Inflammation research : official journal of the European Histamine Research Society [et al]* 61, 1063-1067.
- Ganguly, P., El-Jawhari, J.J., Giannoudis, P.V., Burska, A.N., Ponchel, F., and Jones, E.A. (2017). Age-related Changes in Bone Marrow Mesenchymal Stromal Cells: A Potential Impact on Osteoporosis and Osteoarthritis Development. *Cell transplantation* 26, 1520-1529.
- Garderet, L., Mazurier, C., Chapel, A., Ernou, I., Boutin, L., Holy, X., Gorin, N.C., Lopez, M., Doucet, C., and Lataillade, J.J. (2007). Mesenchymal stem cell abnormalities in patients with multiple myeloma. *Leukemia & lymphoma* 48, 2032-2041.
- Garrett, I.R., Chen, D., Gutierrez, G., Zhao, M., Escobedo, A., Rossini, G., Harris, S.E., Gallwitz, W., Kim, K.B., Hu, S., *et al.* (2003). Selective inhibitors of the osteoblast proteasome stimulate bone formation in vivo and in vitro. *The Journal of clinical investigation* 111, 1771-1782.
- Ge, J., Guo, L., Wang, S., Zhang, Y., Cai, T., Zhao, R.C., and Wu, Y. (2014). The size of mesenchymal stem cells is a significant cause of vascular obstructions and stroke. *Stem Cell Rev* 10, 295-303.
- Gentleman, R.C., Carey, V.J., Bates, D.M., Bolstad, B., Dettling, M., Dudoit, S., Ellis, B., Gautier, L., Ge, Y., Gentry, J., *et al.* (2004). Bioconductor: open software development for computational biology and bioinformatics. *Genome biology* 5, R80.
- Gilbert, J., Lee, J.W., Argiris, A., Haigentz, M., Jr., Feldman, L.E., Jang, M., Arun, P., Van Waes, C., and Forastiere, A.A. (2013). Phase II 2-arm trial of the proteasome inhibitor, PS-341 (bortezomib) in combination with irinotecan or PS-341 alone followed by the addition of irinotecan at time of progression in patients with locally recurrent or metastatic squamous cell carcinoma of the head and neck (E1304): a trial of the Eastern Cooperative Oncology Group. *Head & neck* 35, 942-948.
- Giuliani, N., Bataille, R., Mancini, C., Lazzaretti, M., and Barille, S. (2001). Myeloma cells induce imbalance in the osteoprotegerin/osteoprotegerin ligand system in the human bone marrow environment. *Blood* 98, 3527-3533.
- Giuliani, N., Colla, S., Sala, R., Moroni, M., Lazzaretti, M., La Monica, S., Bonomini, S., Hojden, M., Sammarelli, G., Barille, S., *et al.* (2002). Human myeloma cells stimulate the receptor activator of

nuclear factor-kappa B ligand (RANKL) in T lymphocytes: a potential role in multiple myeloma bone disease. *Blood* 100, 4615-4621.

Giuliani, N., Ferretti, M., Bolzoni, M., Storti, P., Lazzaretti, M., Dalla Palma, B., Bonomini, S., Martella, E., Agnelli, L., Neri, A., *et al.* (2012). Increased osteocyte death in multiple myeloma patients: role in myeloma-induced osteoclast formation. *Leukemia* 26, 1391-1401.

Giuliani, N., Morandi, F., Tagliaferri, S., Lazzaretti, M., Bonomini, S., Crugnola, M., Mancini, C., Martella, E., Ferrari, L., Tabilio, A., *et al.* (2007). The proteasome inhibitor bortezomib affects osteoblast differentiation in vitro and in vivo in multiple myeloma patients. *Blood* 110, 334-338.

Godara, G., Cannon, G.W., Cannon, G.M., Jr., Bies, R.R., Nelson, J.B., and Pflug, B.R. (2005). Role of endothelin axis in progression to aggressive phenotype of prostate adenocarcinoma. *The Prostate* 65, 27-34.

Goldberg, A.L., Cascio, P., Saric, T., and Rock, K.L. (2002). The importance of the proteasome and subsequent proteolytic steps in the generation of antigenic peptides. *Molecular immunology* 39, 147-164.

Gomez-Bougie, P., Wullemme-Toumi, S., Menoret, E., Trichet, V., Robillard, N., Philippe, M., Bataille, R., and Amiot, M. (2007). Noxa up-regulation and Mcl-1 cleavage are associated to apoptosis induction by bortezomib in multiple myeloma. *Cancer research* 67, 5418-5424.

Gornall, A.G., Bardawill, C.J., and David, M.M. (1949). Determination of serum proteins by means of the biuret reaction. *The Journal of biological chemistry* 177, 751-766.

Gozzetti, A., Papini, G., Candi, V., Brambilla, C.Z., Sirianni, S., and Bocchia, M. (2017). Second Generation Proteasome Inhibitors in Multiple Myeloma. *Anticancer Agents Med Chem* 17, 920-926.

Grant, K., Knowles, J., Dawas, K., Burnstock, G., Taylor, I., and Loizidou, M. (2007). Mechanisms of endothelin 1-stimulated proliferation in colorectal cancer cell lines. *The British journal of surgery* 94, 106-112.

Gregoret, M.G., Gottardi, D., Ghia, P., Bergui, L., Merico, F., Marchisio, P.C., and Caligaris-Cappio, F. (1994). Characterization of bone marrow stromal cells from multiple myeloma. *Leukemia research* 18, 675-682.

Gregory, C.A., Singh, H., Perry, A.S., and Prockop, D.J. (2003). The Wnt signaling inhibitor dickkopf-1 is required for reentry into the cell cycle of human adult stem cells from bone marrow. *The Journal of biological chemistry* 278, 28067-28078.

Gregory, C.A., Ylostalo, J., and Prockop, D.J. (2005). Adult bone marrow stem/progenitor cells (MSCs) are preconditioned by microenvironmental "niches" in culture: a two-stage hypothesis for regulation of MSC fate. *Science's STKE : signal transduction knowledge environment* 2005, pe37.

Griffin, T.A., Nandi, D., Cruz, M., Fehling, H.J., Kaer, L.V., Monaco, J.J., and Colbert, R.A. (1998). Immunoproteasome assembly: cooperative incorporation of interferon gamma (IFN-gamma)-inducible subunits. *The Journal of experimental medicine* 187, 97-104.

Groll, M., Bajorek, M., Kohler, A., Moroder, L., Rubin, D.M., Huber, R., Glickman, M.H., and Finley, D. (2000). A gated channel into the proteasome core particle. *Nature structural biology* 7, 1062-1067.

Groll, M., Berkers, C.R., Ploegh, H.L., and Ova, H. (2006). Crystal structure of the boronic acid-based proteasome inhibitor bortezomib in complex with the yeast 20S proteasome. *Structure* 14, 451-456.

- Groll, M., Heinemeyer, W., Jager, S., Ullrich, T., Bochtler, M., Wolf, D.H., and Huber, R. (1999). The catalytic sites of 20S proteasomes and their role in subunit maturation: a mutational and crystallographic study. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 96, 10976-10983.
- Gupta, D., Treon, S.P., Shima, Y., Hideshima, T., Podar, K., Tai, Y.T., Lin, B., Lentzsch, S., Davies, F.E., Chauhan, D., *et al.* (2001). Adherence of multiple myeloma cells to bone marrow stromal cells upregulates vascular endothelial growth factor secretion: therapeutic applications. *Leukemia* 15, 1950-1961.
- Habib, N.A., Hershman, M.J., Kelly, S.B., Taylor, G., Williamson, R.C., and Wood, C.B. (1989). Clinical experience with CA-50 in the serum of carcinoma patients. *European journal of surgical oncology : the journal of the European Society of Surgical Oncology and the British Association of Surgical Oncology* 15, 361-366.
- Hamilton, M.S., Ball, J., Bromidge, E., Lowe, J., and Franklin, I.M. (1990). Characterization of new IgG lambda myeloma plasma cell line (EJM): a further tool in the investigation of the biology of multiple myeloma. *British journal of haematology* 75, 378-384.
- Hamouda, M.A., Belhacene, N., Puissant, A., Colosetti, P., Robert, G., Jacquel, A., Mari, B., Auberger, P., and Luciano, F. (2014). The small heat shock protein B8 (HSPB8) confers resistance to bortezomib by promoting autophagic removal of misfolded proteins in multiple myeloma cells. *Oncotarget* 5, 6252-6266.
- Hanna, J., Hathaway, N.A., Tone, Y., Crosas, B., Elsasser, S., Kirkpatrick, D.S., Leggett, D.S., Gygi, S.P., King, R.W., and Finley, D. (2006). Deubiquitinating enzyme Ubp6 functions noncatalytically to delay proteasomal degradation. *Cell* 127, 99-111.
- Hao, M., Zhang, L., An, G., Sui, W., Yu, Z., Zou, D., Xu, Y., Chang, H., and Qiu, L. (2011). Suppressing miRNA-15a/-16 expression by interleukin-6 enhances drug-resistance in myeloma cells. *Journal of hematology & oncology* 4, 37.
- Harrington DP, Fleming TR. (1982). A Class of Rank Test Procedures for Censored Survival Data. *Biometrika* 69(3), 553-566.
- Heider, U., Kaiser, M., Muller, C., Jakob, C., Zavrski, I., Schulz, C.O., Fleissner, C., Hecht, M., and Sezer, O. (2006). Bortezomib increases osteoblast activity in myeloma patients irrespective of response to treatment. *European journal of haematology* 77, 233-238.
- Heinemeyer, W., Fischer, M., Krimmer, T., Stachon, U., and Wolf, D.H. (1997). The active sites of the eukaryotic 20 S proteasome and their involvement in subunit precursor processing. *The Journal of biological chemistry* 272, 25200-25209.
- Hershko, A., and Ciechanover, A. (1992). The ubiquitin system for protein degradation. *Annual review of biochemistry* 61, 761-807.
- Hershko, A., and Ciechanover, A. (1998). The ubiquitin system. *Annual review of biochemistry* 67, 425-479.
- Hideshima, T., Bergsagel, P.L., Kuehl, W.M., and Anderson, K.C. (2004a). Advances in biology of multiple myeloma: clinical applications. *Blood* 104, 607-618.

- Hideshima, T., Chauhan, D., Podar, K., Schlossman, R.L., Richardson, P., and Anderson, K.C. (2001a). Novel therapies targeting the myeloma cell and its bone marrow microenvironment. *Seminars in oncology* 28, 607-612.
- Hideshima, T., Chauhan, D., Richardson, P., Mitsiades, C., Mitsiades, N., Hayashi, T., Munshi, N., Dang, L., Castro, A., Palombella, V., *et al.* (2002). NF-kappa B as a therapeutic target in multiple myeloma. *The Journal of biological chemistry* 277, 16639-16647.
- Hideshima, T., Chauhan, D., Schlossman, R., Richardson, P., and Anderson, K.C. (2001b). The role of tumor necrosis factor alpha in the pathophysiology of human multiple myeloma: therapeutic applications. *Oncogene* 20, 4519-4527.
- Hideshima, T., Ikeda, H., Chauhan, D., Okawa, Y., Raje, N., Podar, K., Mitsiades, C., Munshi, N.C., Richardson, P.G., Carrasco, R.D., *et al.* (2009). Bortezomib induces canonical nuclear factor-kappaB activation in multiple myeloma cells. *Blood* 114, 1046-1052.
- Hideshima, T., Mitsiades, C., Akiyama, M., Hayashi, T., Chauhan, D., Richardson, P., Schlossman, R., Podar, K., Munshi, N.C., Mitsiades, N., *et al.* (2003). Molecular mechanisms mediating antimyeloma activity of proteasome inhibitor PS-341. *Blood* 101, 1530-1534.
- Hideshima, T., Mitsiades, C., Tonon, G., Richardson, P.G., and Anderson, K.C. (2007). Understanding multiple myeloma pathogenesis in the bone marrow to identify new therapeutic targets. *Nature reviews Cancer* 7, 585-598.
- Hideshima, T., Podar, K., Chauhan, D., Ishitsuka, K., Mitsiades, C., Tai, Y.T., Hamasaki, M., Raje, N., Hideshima, H., Schreiner, G., *et al.* (2004b). p38 MAPK inhibition enhances PS-341 (bortezomib)-induced cytotoxicity against multiple myeloma cells. *Oncogene* 23, 8766-8776.
- Hideshima, T., Richardson, P., Chauhan, D., Palombella, V.J., Elliott, P.J., Adams, J., and Anderson, K.C. (2001c). The proteasome inhibitor PS-341 inhibits growth, induces apoptosis, and overcomes drug resistance in human multiple myeloma cells. *Cancer research* 61, 3071-3076.
- Hirano, Y., Hayashi, H., Iemura, S., Hendil, K.B., Niwa, S., Kishimoto, T., Kasahara, M., Natsume, T., Tanaka, K., and Murata, S. (2006). Cooperation of multiple chaperones required for the assembly of mammalian 20S proteasomes. *Molecular cell* 24, 977-984.
- Hirano, Y., Hendil, K.B., Yashiroda, H., Iemura, S., Nagane, R., Hioki, Y., Natsume, T., Tanaka, K., and Murata, S. (2005). A heterodimeric complex that promotes the assembly of mammalian 20S proteasomes. *Nature* 437, 1381-1385.
- Ho, A.D., Wagner, W., and Franke, W. (2008). Heterogeneity of mesenchymal stromal cell preparations. *Cytotherapy* 10, 320-330.
- Hongming, H., and Jian, H. (2009). Bortezomib inhibits maturation and function of osteoclasts from PBMCs of patients with multiple myeloma by downregulating TRAF6. *Leukemia research* 33, 115-122.
- Hosoda, K., Nakao, K., Hiroshi, A., Suga, S., Ogawa, Y., Mukoyama, M., Shirakami, G., Saito, Y., Nakanishi, S., and Imura, H. (1991). Cloning and expression of human endothelin-1 receptor cDNA. *FEBS letters* 287, 23-26.
- Hou, T., Xu, J., Wu, X., Xie, Z., Luo, F., Zhang, Z., and Zeng, L. (2009). Umbilical cord Wharton's Jelly: a new potential cell source of mesenchymal stromal cells for bone tissue engineering. *Tissue Eng Part A* 15, 2325-2334.

- Huang, G.T., Gronthos, S., and Shi, S. (2009). Mesenchymal stem cells derived from dental tissues vs. those from other sources: their biology and role in regenerative medicine. *Journal of dental research* 88, 792-806.
- Huber, E.M., Basler, M., Schwab, R., Heinemeyer, W., Kirk, C.J., Groettrup, M., and Groll, M. (2012). Immuno- and constitutive proteasome crystal structures reveal differences in substrate and inhibitor specificity. *Cell* 148, 727-738.
- Inoue, A., Yanagisawa, M., Kimura, S., Kasuya, Y., Miyauchi, T., Goto, K., and Masaki, T. (1989a). The human endothelin family: three structurally and pharmacologically distinct isopeptides predicted by three separate genes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 86, 2863-2867.
- Inoue, A., Yanagisawa, M., Takuwa, Y., Mitsui, Y., Kobayashi, M., and Masaki, T. (1989b). The human preproendothelin-1 gene. Complete nucleotide sequence and regulation of expression. *The Journal of biological chemistry* 264, 14954-14959.
- Irani, S., Salajegheh, A., Gopalan, V., Smith, R.A., and Lam, A.K. (2014a). Expression profile of endothelin 1 and its receptor endothelin receptor A in papillary thyroid carcinoma and their correlations with clinicopathologic characteristics. *Annals of diagnostic pathology* 18, 43-48.
- Irani, S., Salajegheh, A., Smith, R.A., and Lam, A.K. (2014b). A review of the profile of endothelin axis in cancer and its management. *Critical reviews in oncology/hematology* 89, 314-321.
- Isasa, M., Katz, E.J., Kim, W., Yugo, V., Gonzalez, S., Kirkpatrick, D.S., Thomson, T.M., Finley, D., Gygi, S.P., and Crosas, B. (2010). Monoubiquitination of RPN10 regulates substrate recruitment to the proteasome. *Molecular cell* 38, 733-745.
- Ishida, H., Kogaki, S., Ichimori, H., Narita, J., Nawa, N., Ueno, T., Takahashi, K., Kayatani, F., Kishimoto, H., Nakayama, M., *et al.* (2012). Overexpression of endothelin-1 and endothelin receptors in the pulmonary arteries of failed Fontan patients. *International journal of cardiology* 159, 34-39.
- Ishimoto, S., Wada, K., Tanaka, N., Yamanishi, T., Ishihama, K., Aikawa, T., Okura, M., Nakajima, A., Kogo, M., and Kamisaki, Y. (2012). Role of endothelin receptor signalling in squamous cell carcinoma. *International journal of oncology* 40, 1011-1019.
- Jagannath, S., Barlogie, B., Berenson, J., Siegel, D., Irwin, D., Richardson, P.G., Niesvizky, R., Alexanian, R., Limentani, S.A., Alsina, M., *et al.* (2004). A phase 2 study of two doses of bortezomib in relapsed or refractory myeloma. *British journal of haematology* 127, 165-172.
- Jagannath, S., Durie, B.G., Wolf, J., Camacho, E., Irwin, D., Lutzky, J., McKinley, M., Gabayan, E., Mazumder, A., Schenkein, D., *et al.* (2005). Bortezomib therapy alone and in combination with dexamethasone for previously untreated symptomatic multiple myeloma. *British journal of haematology* 129, 776-783.
- James, N.D., Caty, A., Payne, H., Borre, M., Zonnenberg, B.A., Beuzeboc, P., McIntosh, S., Morris, T., Phung, D., and Dawson, N.A. (2010). Final safety and efficacy analysis of the specific endothelin A receptor antagonist zibotentan (ZD4054) in patients with metastatic castration-resistant prostate cancer and bone metastases who were pain-free or mildly symptomatic for pain: a double-blind, placebo-controlled, randomized Phase II trial. *BJU international* 106, 966-973.
- Johnson, W.E., Li, C., and Rabinovic, A. (2007). Adjusting batch effects in microarray expression data using empirical Bayes methods. *Biostatistics* 8, 118-127.

- Kaiser, M.F., Heider, U., Mieth, M., Zang, C., von Metzler, I., and Sezer, O. (2013). The proteasome inhibitor bortezomib stimulates osteoblastic differentiation of human osteoblast precursors via upregulation of vitamin D receptor signalling. *European journal of haematology* 90, 263-272.
- Kane, R.C., Farrell, A.T., Sridhara, R., and Pazdur, R. (2006). United States Food and Drug Administration approval summary: bortezomib for the treatment of progressive multiple myeloma after one prior therapy. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* 12, 2955-2960.
- Kaplan EL, Meier P. (1958). Nonparametric Estimation from Incomplete Observations. *Journal of the American Statistical Association* 53(282), 457-481.
- Kassem, M., Ankersen, L., Eriksen, E.F., Clark, B.F., and Rattan, S.I. (1997). Demonstration of cellular aging and senescence in serially passaged long-term cultures of human trabecular osteoblasts. *Osteoporosis international : a journal established as result of cooperation between the European Foundation for Osteoporosis and the National Osteoporosis Foundation of the USA* 7, 514-524.
- Katagiri, S., Yonezawa, T., Kuyama, J., Kanayama, Y., Nishida, K., Abe, T., Tamaki, T., Ohnishi, M., and Tarui, S. (1985). Two distinct human myeloma cell lines originating from one patient with myeloma. *International journal of cancer Journal international du cancer* 36, 241-246.
- Kawanabe, Y., and Nauli, S.M. (2011). Endothelin. *Cellular and molecular life sciences : CMLS* 68, 195-203.
- Kincaid, E.Z., Che, J.W., York, I., Escobar, H., Reyes-Vargas, E., Delgado, J.C., Welsh, R.M., Karow, M.L., Murphy, A.J., Valenzuela, D.M., *et al.* (2011). Mice completely lacking immunoproteasomes show major changes in antigen presentation. *Nature immunology* 13, 129-135.
- Kirshner, J., Thulien, K.J., Martin, L.D., Debes Marun, C., Reiman, T., Belch, A.R., and Pilarski, L.M. (2008). A unique three-dimensional model for evaluating the impact of therapy on multiple myeloma. *Blood* 112, 2935-2945.
- Kisselev, A.F., Akopian, T.N., Woo, K.M., and Goldberg, A.L. (1999). The sizes of peptides generated from protein by mammalian 26 and 20 S proteasomes. Implications for understanding the degradative mechanism and antigen presentation. *The Journal of biological chemistry* 274, 3363-3371.
- Kisselev, A.F., Callard, A., and Goldberg, A.L. (2006). Importance of the different proteolytic sites of the proteasome and the efficacy of inhibitors varies with the protein substrate. *The Journal of biological chemistry* 281, 8582-8590.
- Klein, B., Seckinger, A., Moehler, T., and Hose, D. (2011). Molecular pathogenesis of multiple myeloma: chromosomal aberrations, changes in gene expression, cytokine networks, and the bone marrow microenvironment. *Recent results in cancer research Fortschritte der Krebsforschung Progres dans les recherches sur le cancer* 183, 39-86.
- Kniepert, A., and Groettrup, M. (2014). The unique functions of tissue-specific proteasomes. *Trends Biochem Sci* 39, 17-24.
- Kobrinisky, B., Joseph, S.O., Muggia, F., Liebes, L., Beric, A., Malankar, A., Ivy, P., and Hochster, H. (2013). A phase I and pharmacokinetic study of oxaliplatin and bortezomib: activity, but dose-limiting neurotoxicity. *Cancer chemotherapy and pharmacology* 72, 1073-1078.

- Kole, P.L., Venkatesh, G., Kotecha, J., and Sheshala, R. (2011). Recent advances in sample preparation techniques for effective bioanalytical methods. *Biomedical chromatography : BMC* 25, 199-217.
- Kossa J. (1901). Ueber die im Organismus kunstlich erzeugbaren Verkalkungen. *Beit Path Anat* 29:163.
- Konstantinova, I.M., Tsimokha, A.S., and Mittenberg, A.G. (2008). Role of proteasomes in cellular regulation. *International review of cell and molecular biology* 267, 59-124.
- Kostova, Z., and Wolf, D.H. (2003). For whom the bell tolls: protein quality control of the endoplasmic reticulum and the ubiquitin-proteasome connection. *The EMBO journal* 22, 2309-2317.
- Koulich, E., Li, X., and DeMartino, G.N. (2008). Relative structural and functional roles of multiple deubiquitylating proteins associated with mammalian 26S proteasome. *Molecular biology of the cell* 19, 1072-1082.
- Kristianto, J., Johnson, M.G., Afzal, R., and Blank, R.D. (2017). Endothelin Signaling in Bone. *Endocrinol Metab Clin North Am* 46, 51-62.
- Kubiczkova, L., Pour, L., Sedlarikova, L., Hajek, R., and Sevcikova, S. (2014). Proteasome inhibitors - molecular basis and current perspectives in multiple myeloma. *Journal of cellular and molecular medicine* 18, 947-961.
- Kuhn, D.J., Berkova, Z., Jones, R.J., Woessner, R., Bjorklund, C.C., Ma, W., Davis, R.E., Lin, P., Wang, H., Madden, T.L., *et al.* (2012). Targeting the insulin-like growth factor-1 receptor to overcome bortezomib resistance in preclinical models of multiple myeloma. *Blood* 120, 3260-3270.
- Kuhn, D.J., Hunsucker, S.A., Chen, Q., Voorhees, P.M., Orlowski, M., and Orlowski, R.Z. (2009). Targeted inhibition of the immunoproteasome is a potent strategy against models of multiple myeloma that overcomes resistance to conventional drugs and nonspecific proteasome inhibitors. *Blood* 113, 4667-4676.
- Kumar, S.K., Callander, N.S., Alsina, M., Atanackovic, D., Biermann, J.S., Chandler, J.C., Costello, C., Faiman, M., Fung, H.C., Gasparetto, C., *et al.* (2017a). Multiple Myeloma, Version 3.2017, NCCN Clinical Practice Guidelines in Oncology. *Journal of the National Comprehensive Cancer Network : JNCCN* 15, 230-269.
- Kumar, S.K., Jett, J., Marks, R., Richardson, R., Quevedo, F., Moynihan, T., Croghan, G., Markovic, S.N., Bible, K.C., Qin, R., *et al.* (2013). Phase 1 study of sorafenib in combination with bortezomib in patients with advanced malignancies. *Investigational new drugs* 31, 1201-1206.
- Kumar, S.K., Rajkumar, S.V., Dispenzieri, A., Lacy, M.Q., Hayman, S.R., Buadi, F.K., Zeldenrust, S.R., Dingli, D., Russell, S.J., Lust, J.A., *et al.* (2008). Improved survival in multiple myeloma and the impact of novel therapies. *Blood* 111, 2516-2520.
- Kumar, S.K., Rajkumar, V., Kyle, R.A., van Duin, M., Sonneveld, P., Mateos, M.V., Gay, F., and Anderson, K.C. (2017b). Multiple myeloma. *Nat Rev Dis Primers* 3, 17046.
- Laemmli, U.K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227, 680-685.
- Landgren, O., and Rajkumar, S.V. (2016). New Developments in Diagnosis, Prognosis, and Assessment of Response in Multiple Myeloma. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* 22, 5428-5433.

- Landowski, T.H., Megli, C.J., Nullmeyer, K.D., Lynch, R.M., and Dorr, R.T. (2005). Mitochondrial-mediated dysregulation of Ca^{2+} is a critical determinant of Velcade (PS-341/bortezomib) cytotoxicity in myeloma cell lines. *Cancer research* 65, 3828-3836.
- Lanzani, F., Mattavelli, L., Frigeni, B., Rossini, F., Cammarota, S., Petro, D., Jann, S., and Cavaletti, G. (2008). Role of a pre-existing neuropathy on the course of bortezomib-induced peripheral neurotoxicity. *Journal of the peripheral nervous system : JPNS* 13, 267-274.
- LeBlanc, R., Catley, L.P., Hideshima, T., Lentzsch, S., Mitsiades, C.S., Mitsiades, N., Neuberg, D., Goloubeva, O., Pien, C.S., Adams, J., *et al.* (2002). Proteasome inhibitor PS-341 inhibits human myeloma cell growth in vivo and prolongs survival in a murine model. *Cancer research* 62, 4996-5000.
- Lee, A.H., Iwakoshi, N.N., Anderson, K.C., and Glimcher, L.H. (2003). Proteasome inhibitors disrupt the unfolded protein response in myeloma cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 100, 9946-9951.
- Lee, I., and Schindelin, H. (2008). Structural insights into E1-catalyzed ubiquitin activation and transfer to conjugating enzymes. *Cell* 134, 268-278.
- Lee, J.W., Chung, H.Y., Ehrlich, L.A., Jelinek, D.F., Callander, N.S., Roodman, G.D., and Choi, S.J. (2004). IL-3 expression by myeloma cells increases both osteoclast formation and growth of myeloma cells. *Blood* 103, 2308-2315.
- Lennon, D.P., and Caplan, A.I. (2006). Isolation of human marrow-derived mesenchymal stem cells. *Experimental hematology* 34, 1604-1605.
- Leung-Hagesteijn, C., Erdmann, N., Cheung, G., Keats, J.J., Stewart, A.K., Reece, D.E., Chung, K.C., and Tiedemann, R.E. (2013). Xbp1s-negative tumor B cells and pre-plasmablasts mediate therapeutic proteasome inhibitor resistance in multiple myeloma. *Cancer cell* 24, 289-304.
- Li, B., Fu, J., Chen, P., Ge, X., Li, Y., Kuatse, I., Wang, H., Wang, H., Zhang, X., and Orlowski, R.Z. (2015). The Nuclear Factor (Erythroid-derived 2)-like 2 and Proteasome Maturation Protein Axis Mediate Bortezomib Resistance in Multiple Myeloma. *The Journal of biological chemistry* 290, 29854-29868.
- Li, C., Chen, S., Yue, P., Deng, X., Lonial, S., Khuri, F.R., and Sun, S.Y. (2010a). Proteasome inhibitor PS-341 (bortezomib) induces calpain-dependent I κ B(α) degradation. *The Journal of biological chemistry* 285, 16096-16104.
- Li, N., and Hua, J. (2017). Interactions between mesenchymal stem cells and the immune system. *Cellular and molecular life sciences : CMLS* 74, 2345-2360.
- Li, T., Ho, L., Piperdi, B., Elrafei, T., Camacho, F.J., Rigas, J.R., Perez-Soler, R., and Gucaip, R. (2010b). Phase II study of the proteasome inhibitor bortezomib (PS-341, Velcade) in chemotherapy-naïve patients with advanced stage non-small cell lung cancer (NSCLC). *Lung Cancer* 68, 89-93.
- Liakou, P., Tepetes, K., Germenis, A., Leventaki, V., Atsaves, V., Patsouris, E., Roidis, N., Hatzitheophilou, K., and Rassidakis, G.Z. (2012). Expression patterns of endothelin-1 and its receptors in colorectal cancer. *Journal of surgical oncology* 105, 643-649.
- Lightcap, E.S., McCormack, T.A., Pien, C.S., Chau, V., Adams, J., and Elliott, P.J. (2000). Proteasome inhibition measurements: clinical application. *Clinical chemistry* 46, 673-683.

- Lindl, T., Lewandowski, B., Schreyogg, S., and Staudte, A. (2005). An evaluation of the in vitro cytotoxicities of 50 chemicals by using an electrical current exclusion method versus the neutral red uptake and MTT assays. *Alternatives to laboratory animals : ATLA* 33, 591-601.
- Ling, S.C., Lau, E.K., Al-Shabeeb, A., Nikolic, A., Catalano, A., Iland, H., Horvath, N., Ho, P.J., Harrison, S., Fleming, S., *et al.* (2012). Response of myeloma to the proteasome inhibitor bortezomib is correlated with the unfolded protein response regulator XBP-1. *Haematologica* 97, 64-72.
- Livneh, I., Cohen-Kaplan, V., Cohen-Rosenzweig, C., Avni, N., and Ciechanover, A. (2016). The life cycle of the 26S proteasome: from birth, through regulation and function, and onto its death. *Cell research* 26, 869-885.
- Lohr, J.G., Stojanov, P., Carter, S.L., Cruz-Gordillo, P., Lawrence, M.S., Auclair, D., Sougnez, C., Knoechel, B., Gould, J., Saksena, G., *et al.* (2014). Widespread genetic heterogeneity in multiple myeloma: implications for targeted therapy. *Cancer cell* 25, 91-101.
- Lokireddy, S., Kukushkin, N.V., and Goldberg, A.L. (2015). cAMP-induced phosphorylation of 26S proteasomes on Rpn6/PSMD11 enhances their activity and the degradation of misfolded proteins. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 112, E7176-7185.
- Lonial, S., Waller, E.K., Richardson, P.G., Jagannath, S., Orlowski, R.Z., Giver, C.R., Jaye, D.L., Francis, D., Giusti, S., Torre, C., *et al.* (2005). Risk factors and kinetics of thrombocytopenia associated with bortezomib for relapsed, refractory multiple myeloma. *Blood* 106, 3777-3784.
- Lu, S., Chen, Z., Yang, J., Chen, L., Gong, S., Zhou, H., Guo, L., and Wang, J. (2008). Overexpression of the PSMB5 gene contributes to bortezomib resistance in T-lymphoblastic lymphoma/leukemia cells derived from Jurkat line. *Experimental hematology* 36, 1278-1284.
- Macauda, A., Calveti, D., Maccari, G., Hemminki, K., Forsti, A., Goldschmidt, H., Weinhold, N., Houlston, R., Andersen, V., Vogel, U., *et al.* (2017). Identification of miRNPs associated with the risk of multiple myeloma. *International journal of cancer Journal international du cancer* 140, 526-534.
- Madan, B.R., Madan, V., Pendse, V.K., and Gupta, R.S. (1970). A study of the antiarrhythmic and local anaesthetic actions of phencarbamide. *Arch Int Pharmacodyn Ther* 185, 53-65.
- Mai, H.Q., Zeng, Z.Y., Feng, K.T., Ye, Y.L., Zhang, C.Q., Liang, W.J., Guo, X., Mo, H.Y., and Hong, M.H. (2006). Therapeutic targeting of the endothelin a receptor in human nasopharyngeal carcinoma. *Cancer science* 97, 1388-1395.
- Manier, S., Salem, K., Glavey, S.V., Roccaro, A.M., and Ghobrial, I.M. (2016). Genomic Aberrations in Multiple Myeloma. *Cancer Treat Res* 169, 23-34.
- Mannello, F., and Tonti, G.A. (2007). Concise review: no breakthroughs for human mesenchymal and embryonic stem cell culture: conditioned medium, feeder layer, or feeder-free; medium with fetal calf serum, human serum, or enriched plasma; serum-free, serum replacement nonconditioned medium, or ad hoc formula? All that glitters is not gold! *Stem cells* 25, 1603-1609.
- Markovina, S., Callander, N.S., O'Connor, S.L., Kim, J., Werndli, J.E., Raschko, M., Leith, C.P., Kahl, B.S., Kim, K., and Miyamoto, S. (2008). Bortezomib-resistant nuclear factor-kappaB activity in multiple myeloma cells. *Molecular cancer research : MCR* 6, 1356-1364.
- Mateos, M.V., and San Miguel, J.F. (2012). Safety and efficacy of subcutaneous formulation of bortezomib versus the conventional intravenous formulation in multiple myeloma. *Therapeutic advances in hematology* 3, 117-124.

- Matsuoka, Y., Moore, G.E., Yagi, Y., and Pressman, D. (1967). Production of free light chains of immunoglobulin by a hematopoietic cell line derived from a patient with multiple myeloma. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine Society for Experimental Biology and Medicine* 125, 1246-1250.
- McCullough, K.D., Martindale, J.L., Klotz, L.O., Aw, T.Y., and Holbrook, N.J. (2001). Gadd153 sensitizes cells to endoplasmic reticulum stress by down-regulating Bcl2 and perturbing the cellular redox state. *Molecular and cellular biology* 21, 1249-1259.
- Meads, M.B., Hazlehurst, L.A., and Dalton, W.S. (2008). The bone marrow microenvironment as a tumor sanctuary and contributor to drug resistance. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* 14, 2519-2526.
- Meiners, S., Heyken, D., Weller, A., Ludwig, A., Stangl, K., Kloetzel, P.M., and Kruger, E. (2003). Inhibition of proteasome activity induces concerted expression of proteasome genes and de novo formation of Mammalian proteasomes. *The Journal of biological chemistry* 278, 21517-21525.
- Meister, S., Schubert, U., Neubert, K., Herrmann, K., Burger, R., Gramatzki, M., Hahn, S., Schreiber, S., Wilhelm, S., Herrmann, M., *et al.* (2007). Extensive immunoglobulin production sensitizes myeloma cells for proteasome inhibition. *Cancer research* 67, 1783-1792.
- Melton, L.J., 3rd, Kyle, R.A., Achenbach, S.J., Oberg, A.L., and Rajkumar, S.V. (2005). Fracture risk with multiple myeloma: a population-based study. *Journal of bone and mineral research : the official journal of the American Society for Bone and Mineral Research* 20, 487-493.
- Meregalli, C. (2015). An Overview of Bortezomib-Induced Neurotoxicity. *Toxics* 3, 294-303.
- Michigami, T., Shimizu, N., Williams, P.J., Niewolna, M., Dallas, S.L., Mundy, G.R., and Yoneda, T. (2000). Cell-cell contact between marrow stromal cells and myeloma cells via VCAM-1 and alpha(4)beta(1)-integrin enhances production of osteoclast-stimulating activity. *Blood* 96, 1953-1960.
- Mirabella, A.C., Pletnev, A.A., Downey, S.L., Florea, B.I., Shabaneh, T.B., Britton, M., Verdoes, M., Filippov, D.V., Overkleeft, H.S., and Kisselev, A.F. (2011). Specific cell-permeable inhibitor of proteasome trypsin-like sites selectively sensitizes myeloma cells to bortezomib and carfilzomib. *Chemistry & biology* 18, 608-618.
- Mitsiades, C.S., McMillin, D.W., Klippel, S., Hideshima, T., Chauhan, D., Richardson, P.G., Munshi, N.C., and Anderson, K.C. (2007). The role of the bone marrow microenvironment in the pathophysiology of myeloma and its significance in the development of more effective therapies. *Hematology/oncology clinics of North America* 21, 1007-1034, vii-viii.
- Mitsiades, C.S., Mitsiades, N.S., McMullan, C.J., Poulaki, V., Kung, A.L., Davies, F.E., Morgan, G., Akiyama, M., Shringarpure, R., Munshi, N.C., *et al.* (2006). Antimyeloma activity of heat shock protein-90 inhibition. *Blood* 107, 1092-1100.
- Mitsiades, N., Mitsiades, C.S., Poulaki, V., Chauhan, D., Fanourakis, G., Gu, X., Bailey, C., Joseph, M., Libermann, T.A., Treon, S.P., *et al.* (2002). Molecular sequelae of proteasome inhibition in human multiple myeloma cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 99, 14374-14379.
- Mitsiades, N., Mitsiades, C.S., Richardson, P.G., Poulaki, V., Tai, Y.T., Chauhan, D., Fanourakis, G., Gu, X., Bailey, C., Joseph, M., *et al.* (2003). The proteasome inhibitor PS-341 potentiates sensitivity of

multiple myeloma cells to conventional chemotherapeutic agents: therapeutic applications. *Blood* **101**, 2377-2380.

Mohty, M., Malard, F., Mohty, B., Savani, B., Moreau, P., and Terpos, E. (2014). The effects of bortezomib on bone disease in patients with multiple myeloma. *Cancer* **120**, 618-623.

Moreau, P., Chanan-Khan, A., Roberts, A.W., Agarwal, A.B., Facon, T., Kumar, S., Touzeau, C., Punnoose, E.A., Cordero, J., Munasinghe, W., *et al.* (2017). Promising efficacy and acceptable safety of venetoclax plus bortezomib and dexamethasone in relapsed/refractory MM. *Blood* **130**, 2392-2400.

Moreau, P., Coiteux, V., Hulin, C., Leleu, X., van de Velde, H., Acharya, M., and Harousseau, J.L. (2008). Prospective comparison of subcutaneous versus intravenous administration of bortezomib in patients with multiple myeloma. *Haematologica* **93**, 1908-1911.

Moreau, P., Karamanesht, I., Domnikova, N., Kyselyova, M.Y., Vilchevska, K.V., Doronin, V.A., Schmidt, A., Hulin, C., Leleu, X., Esseltine, D.L., *et al.* (2012). Pharmacokinetic, pharmacodynamic and covariate analysis of subcutaneous versus intravenous administration of bortezomib in patients with relapsed multiple myeloma. *Clinical pharmacokinetics* **51**, 823-829.

Moreau, P., Pylypenko, H., Grosicki, S., Karamanesht, I., Leleu, X., Grishunina, M., Rekhtman, G., Masliak, Z., Robak, T., Shubina, A., *et al.* (2011). Subcutaneous versus intravenous administration of bortezomib in patients with relapsed multiple myeloma: a randomised, phase 3, non-inferiority study. *The Lancet Oncology* **12**, 431-440.

Mori, Y., Shimizu, N., Dallas, M., Niewolna, M., Story, B., Williams, P.J., Mundy, G.R., and Yoneda, T. (2004). Anti- $\alpha 4$ integrin antibody suppresses the development of multiple myeloma and associated osteoclastic osteolysis. *Blood* **104**, 2149-2154.

Mukherjee, S., Raje, N., Schoonmaker, J.A., Liu, J.C., Hideshima, T., Wein, M.N., Jones, D.C., Vallet, S., Buxsein, M.L., Pozzi, S., *et al.* (2008). Pharmacologic targeting of a stem/progenitor population in vivo is associated with enhanced bone regeneration in mice. *The Journal of clinical investigation* **118**, 491-504.

Muraglia, A., Cancedda, R., and Quarto, R. (2000). Clonal mesenchymal progenitors from human bone marrow differentiate in vitro according to a hierarchical model. *Journal of cell science* **113** (Pt 7), 1161-1166.

Murai, K., Kowata, S., Shimoyama, T., Yashima-Abo, A., Fujishima, Y., Ito, S., and Ishida, Y. (2014). Bortezomib induces thrombocytopenia by the inhibition of proplatelet formation of megakaryocytes. *European journal of haematology* **93**, 290-296.

Murata, S., Yashiroda, H., and Tanaka, K. (2009). Molecular mechanisms of proteasome assembly. *Nat Rev Mol Cell Biol* **10**, 104-115.

Murray, M.Y., Auger, M.J., and Bowles, K.M. (2014). Overcoming bortezomib resistance in multiple myeloma. *Biochemical Society transactions* **42**, 804-808.

Mushahary, D., Spittler, A., Kasper, C., Weber, V., and Charwat, V. (2018). Isolation, cultivation, and characterization of human mesenchymal stem cells. *Cytometry Part A : the journal of the International Society for Analytical Cytology* **93**, 19-31.

- Nacheva, E., Fischer, P.E., Sherrington, P.D., Labastide, W., Lawlor, E., Conneally, E., Blaney, C., Hayhoe, F.G., and Karpas, A. (1990). A new human plasma cell line, Karpas 620, with translocations involving chromosomes 1, 11 and 14. *British journal of haematology* 74, 70-76.
- Namba, M., Ohtsuki, T., Mori, M., Togawa, A., Wada, H., Sugihara, T., Yawata, Y., and Kimoto, T. (1989). Establishment of five human myeloma cell lines. *In vitro cellular & developmental biology : journal of the Tissue Culture Association* 25, 723-729.
- Nanes, M.S. (2003). Tumor necrosis factor-alpha: molecular and cellular mechanisms in skeletal pathology. *Gene* 321, 1-15.
- Nayak, M.K., Kulkarni, P.P., and Dash, D. (2013). Regulatory role of proteasome in determination of platelet life span. *The Journal of biological chemistry* 288, 6826-6834.
- Nazif, T., and Bogyo, M. (2001). Global analysis of proteasomal substrate specificity using positional-scanning libraries of covalent inhibitors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 98, 2967-2972.
- Neben, K., Lokhorst, H.M., Jauch, A., Bertsch, U., Hielscher, T., van der Holt, B., Salwender, H., Blau, I.W., Weisel, K., Pfreundschuh, M., *et al.* (2012). Administration of bortezomib before and after autologous stem cell transplantation improves outcome in multiple myeloma patients with deletion 17p. *Blood* 119, 940-948.
- Nefedova, Y., Landowski, T.H., and Dalton, W.S. (2003). Bone marrow stromal-derived soluble factors and direct cell contact contribute to de novo drug resistance of myeloma cells by distinct mechanisms. *Leukemia* 17, 1175-1182.
- Nelson, J.B., Nabulsi, A.A., Vogelzang, N.J., Breul, J., Zonnenberg, B.A., Daliani, D.D., Schulman, C.C., and Carducci, M.A. (2003). Suppression of prostate cancer induced bone remodeling by the endothelin receptor A antagonist atrasentan. *The Journal of urology* 169, 1143-1149.
- Nelson, J.B., Nguyen, S.H., Wu-Wong, J.R., Opgenorth, T.J., Dixon, D.B., Chung, L.W., and Inoue, N. (1999). New bone formation in an osteoblastic tumor model is increased by endothelin-1 overexpression and decreased by endothelin A receptor blockade. *Urology* 53, 1063-1069.
- Nerini-Molteni, S., Ferrarini, M., Cozza, S., Caligaris-Cappio, F., and Sitia, R. (2008). Redox homeostasis modulates the sensitivity of myeloma cells to bortezomib. *British journal of haematology* 141, 494-503.
- Niewerth, D., Franke, N.E., Jansen, G., Assaraf, Y.G., van Meerloo, J., Kirk, C.J., Degenhardt, J., Anderl, J., Schimmer, A.D., Zweegman, S., *et al.* (2013). Higher ratio immune versus constitutive proteasome level as novel indicator of sensitivity of pediatric acute leukemia cells to proteasome inhibitors. *Haematologica* 98, 1896-1904.
- Niewerth, D., Jansen, G., Assaraf, Y.G., Zweegman, S., Kaspers, G.J., and Cloos, J. (2015). Molecular basis of resistance to proteasome inhibitors in hematological malignancies. *Drug resistance updates : reviews and commentaries in antimicrobial and anticancer chemotherapy* 18, 18-35.
- Niewerth, D., Kaspers, G.J., Assaraf, Y.G., van Meerloo, J., Kirk, C.J., Anderl, J., Blank, J.L., van de Ven, P.M., Zweegman, S., Jansen, G., *et al.* (2014a). Interferon-gamma-induced upregulation of immunoproteasome subunit assembly overcomes bortezomib resistance in human hematological cell lines. *Journal of hematology & oncology* 7, 7.

- Niewerth, D., van Meerloo, J., Jansen, G., Assaraf, Y.G., Hendrickx, T.C., Kirk, C.J., Anderl, J.L., Zweegman, S., Kaspers, G.J., and Cloos, J. (2014b). Anti-leukemic activity and mechanisms underlying resistance to the novel immunoproteasome inhibitor PR-924. *Biochemical pharmacology* 89, 43-51.
- Nifontova, I., Svinareva, D., Petrova, T., and Drize, N. (2008). Sensitivity of mesenchymal stem cells and their progeny to medicines used for the treatment of hematoproliferative diseases. *Acta haematologica* 119, 98-103.
- Nilsson, K., Bennich, H., Johansson, S.G., and Ponten, J. (1970). Established immunoglobulin producing myeloma (IgE) and lymphoblastoid (IgG) cell lines from an IgE myeloma patient. *Clinical and experimental immunology* 7, 477-489.
- Noll, J.E., Williams, S.A., Tong, C.M., Wang, H., Quach, J.M., Purton, L.E., Pilkington, K., To, L.B., Evdokiou, A., Gronthos, S., *et al.* (2014). Myeloma plasma cells alter the bone marrow microenvironment by stimulating the proliferation of mesenchymal stromal cells. *Haematologica* 99, 163-171.
- O'Connor, O.A., Moskowitz, C., Portlock, C., Hamlin, P., Straus, D., Dumitrescu, O., Sarasohn, D., Gonen, M., Butos, J., Neylon, E., *et al.* (2009). Patients with chemotherapy-refractory mantle cell lymphoma experience high response rates and identical progression-free survivals compared with patients with relapsed disease following treatment with single agent bortezomib: results of a multicentre Phase 2 clinical trial. *British journal of haematology* 145, 34-39.
- O'Donnell, E.K., and Raje, N.S. (2017). Myeloma bone disease: pathogenesis and treatment. *Clinical advances in hematology & oncology : H&O* 15, 285-295.
- Obeng, E.A., Carlson, L.M., Gutman, D.M., Harrington, W.J., Jr., Lee, K.P., and Boise, L.H. (2006). Proteasome inhibitors induce a terminal unfolded protein response in multiple myeloma cells. *Blood* 107, 4907-4916.
- Oerlemans, R., Franke, N.E., Assaraf, Y.G., Cloos, J., van Zantwijk, I., Berkers, C.R., Scheffer, G.L., Debipersad, K., Vojtekova, K., Lemos, C., *et al.* (2008). Molecular basis of bortezomib resistance: proteasome subunit beta5 (PSMB5) gene mutation and overexpression of PSMB5 protein. *Blood* 112, 2489-2499.
- Ohishi, M., and Schipani, E. (2011). PTH and stem cells. *Journal of endocrinological investigation* 34, 552-556.
- Orlowski, M., and Wilk, S. (2000). Catalytic activities of the 20 S proteasome, a multicatalytic proteinase complex. *Archives of biochemistry and biophysics* 383, 1-16.
- Orlowski, R.Z., and Baldwin, A.S., Jr. (2002). NF-kappaB as a therapeutic target in cancer. *Trends Mol Med* 8, 385-389.
- Orlowski, R.Z., and Kuhn, D.J. (2008). Proteasome inhibitors in cancer therapy: lessons from the first decade. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* 14, 1649-1657.
- Orlowski, R.Z., Stinchcombe, T.E., Mitchell, B.S., Shea, T.C., Baldwin, A.S., Stahl, S., Adams, J., Esseltine, D.L., Elliott, P.J., Pien, C.S., *et al.* (2002). Phase I trial of the proteasome inhibitor PS-341 in patients with refractory hematologic malignancies. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* 20, 4420-4427.

- Ozaki, S., Tanaka, O., Fujii, S., Shigekiyo, Y., Miki, H., Choraku, M., Kagawa, K., Asano, J., Takeuchi, K., Kitazoe, K., *et al.* (2007). Therapy with bortezomib plus dexamethasone induces osteoblast activation in responsive patients with multiple myeloma. *International journal of hematology* 86, 180-185.
- Palombella, V.J., Rando, O.J., Goldberg, A.L., and Maniatis, T. (1994). The ubiquitin-proteasome pathway is required for processing the NF-kappa B1 precursor protein and the activation of NF-kappa B. *Cell* 78, 773-785.
- Palumbo, A., Falco, P., Corradini, P., Falcone, A., Di Raimondo, F., Giuliani, N., Crippa, C., Ciccone, G., Omede, P., Ambrosini, M.T., *et al.* (2007). Melphalan, prednisone, and lenalidomide treatment for newly diagnosed myeloma: a report from the GIMEMA--Italian Multiple Myeloma Network. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* 25, 4459-4465.
- Panaroni, C., Fulzele, K., Saini, V., Chubb, R., Pajevic, P.D., and Wu, J.Y. (2015). PTH Signaling in Osteoprogenitors Is Essential for B-Lymphocyte Differentiation and Mobilization. *Journal of bone and mineral research : the official journal of the American Society for Bone and Mineral Research* 30, 2273-2286.
- Papandreou, C.N., Daliani, D.D., Nix, D., Yang, H., Madden, T., Wang, X., Pien, C.S., Millikan, R.E., Tu, S.M., Pagliaro, L., *et al.* (2004). Phase I trial of the proteasome inhibitor bortezomib in patients with advanced solid tumors with observations in androgen-independent prostate cancer. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* 22, 2108-2121.
- Parlati, F., Lee, S.J., Aujay, M., Suzuki, E., Levitsky, K., Lorens, J.B., Micklem, D.R., Ruurs, P., Sylvain, C., Lu, Y., *et al.* (2009). Carfilzomib can induce tumor cell death through selective inhibition of the chymotrypsin-like activity of the proteasome. *Blood* 114, 3439-3447.
- Parma, G., Mancari, R., Del Conte, G., Scambia, G., Gadducci, A., Hess, D., Katsaros, D., Sessa, C., Rinaldi, A., Bertoni, F., *et al.* (2012). An open-label phase 2 study of twice-weekly bortezomib and intermittent pegylated liposomal doxorubicin in patients with ovarian cancer failing platinum-containing regimens. *Int J Gynecol Cancer* 22, 792-800.
- Patil, C., and Walter, P. (2001). Intracellular signaling from the endoplasmic reticulum to the nucleus: the unfolded protein response in yeast and mammals. *Current opinion in cell biology* 13, 349-355.
- Pegoraro, L., Malavasi, F., Bellone, G., Massaia, M., Boccadoro, M., Saglio, G., Guerrasio, A., Benetton, G., Lombardi, L., Coda, R., *et al.* (1989). The human myeloma cell line LP-1: a versatile model in which to study early plasma-cell differentiation and c-myc activation. *Blood* 73, 1020-1027.
- Pekol, T., Daniels, J.S., Labutti, J., Parsons, I., Nix, D., Baronas, E., Hsieh, F., Gan, L.S., and Miwa, G. (2005). Human metabolism of the proteasome inhibitor bortezomib: identification of circulating metabolites. *Drug metabolism and disposition: the biological fate of chemicals* 33, 771-777.
- Pendleton, C., Li, Q., Chesler, D.A., Yuan, K., Guerrero-Cazares, H., and Quinones-Hinojosa, A. (2013). Mesenchymal stem cells derived from adipose tissue vs bone marrow: in vitro comparison of their tropism towards gliomas. *PLoS one* 8, e58198.
- Pennisi, A., Li, X., Ling, W., Khan, S., Zangari, M., and Yaccoby, S. (2009). The proteasome inhibitor, bortezomib suppresses primary myeloma and stimulates bone formation in myelomatous and nonmyelomatous bones in vivo. *American journal of hematology* 84, 6-14.

- Perez-Galan, P., Mora-Jensen, H., Weniger, M.A., Shaffer, A.L., 3rd, Rizzatti, E.G., Chapman, C.M., Mo, C.C., Stennett, L.S., Rader, C., Liu, P., *et al.* (2011). Bortezomib resistance in mantle cell lymphoma is associated with plasmacytic differentiation. *Blood* 117, 542-552.
- Petrucci, M.T., Finsinger, P., Chisini, M., and Gentilini, F. (2014). Subcutaneous bortezomib for multiple myeloma treatment: patients' benefits. *Patient Prefer Adherence* 8, 939-946.
- Pickering, A.M., Koop, A.L., Teoh, C.Y., Ermak, G., Grune, T., and Davies, K.J. (2010). The immunoproteasome, the 20S proteasome and the PA28 α proteasome regulator are oxidative-stress-adaptive proteolytic complexes. *The Biochemical journal* 432, 585-594.
- Pitcher, D.S., de Mattos-Shiple, K., Tzortzis, K., Auner, H.W., Karadimitris, A., and Kleijnen, M.F. (2015). Bortezomib Amplifies Effect on Intracellular Proteasomes by Changing Proteasome Structure. *EBioMedicine* 2, 642-648.
- Pittenger, M.F., Mackay, A.M., Beck, S.C., Jaiswal, R.K., Douglas, R., Mosca, J.D., Moorman, M.A., Simonetti, D.W., Craig, S., and Marshak, D.R. (1999). Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science* 284, 143-147.
- Podar, K., Shringarpure, R., Tai, Y.T., Simoncini, M., Sattler, M., Ishitsuka, K., Richardson, P.G., Hideshima, T., Chauhan, D., and Anderson, K.C. (2004). Caveolin-1 is required for vascular endothelial growth factor-triggered multiple myeloma cell migration and is targeted by bortezomib. *Cancer research* 64, 7500-7506.
- Pozzi, S., Marcheselli, L., Bari, A., Liardo, E.V., Marcheselli, R., Luminari, S., Quaresima, M., Cirilli, C., Ferri, P., Federico, M., *et al.* (2013). Survival of multiple myeloma patients in the era of novel therapies confirms the improvement in patients younger than 75 years: a population-based analysis. *British journal of haematology* 163, 40-46.
- Qiang, Y.W., Hu, B., Chen, Y., Zhong, Y., Shi, B., Barlogie, B., and Shaughnessy, J.D., Jr. (2009). Bortezomib induces osteoblast differentiation via Wnt-independent activation of beta-catenin/TCF signaling. *Blood* 113, 4319-4330.
- Qiang, Y.W., Ye, S., Huang, Y., Chen, Y., Van Rhee, F., Epstein, J., Walker, B.A., Morgan, G.J., and Davies, F.E. (2018). MAFb protein confers intrinsic resistance to proteasome inhibitors in multiple myeloma. *BMC cancer* 18, 724.
- Qin, J.Z., Ziffra, J., Stennett, L., Bodner, B., Bonish, B.K., Chaturvedi, V., Bennett, F., Pollock, P.M., Trent, J.M., Hendrix, M.J., *et al.* (2005). Proteasome inhibitors trigger NOXA-mediated apoptosis in melanoma and myeloma cells. *Cancer research* 65, 6282-6293.
- Raab, M.S., Podar, K., Breitkreutz, I., Richardson, P.G., and Anderson, K.C. (2009). Multiple myeloma. *Lancet* 374, 324-339.
- Rajkumar, S.V. (2016). Multiple myeloma: 2016 update on diagnosis, risk-stratification, and management. *American journal of hematology* 91, 719-734.
- Rajkumar, S.V., Dimopoulos, M.A., Palumbo, A., Blade, J., Merlini, G., Mateos, M.V., Kumar, S., Hillengass, J., Kastiris, E., Richardson, P., *et al.* (2014). International Myeloma Working Group updated criteria for the diagnosis of multiple myeloma. *The Lancet Oncology* 15, e538-548.
- Rastgoo, N., Abdi, J., Hou, J., and Chang, H. (2017). Role of epigenetics-microRNA axis in drug resistance of multiple myeloma. *Journal of hematology & oncology* 10, 121.

- Rebelatto, C.K., Aguiar, A.M., Moretao, M.P., Senegaglia, A.C., Hansen, P., Barchiki, F., Oliveira, J., Martins, J., Kuligovski, C., Mansur, F., *et al.* (2008). Dissimilar differentiation of mesenchymal stem cells from bone marrow, umbilical cord blood, and adipose tissue. *Experimental biology and medicine* 233, 901-913.
- Reyes, M., Lund, T., Lenvik, T., Aguiar, D., Koodie, L., and Verfaillie, C.M. (2001). Purification and ex vivo expansion of postnatal human marrow mesodermal progenitor cells. *Blood* 98, 2615-2625.
- Reyes, M., and Verfaillie, C.M. (2001). Characterization of multipotent adult progenitor cells, a subpopulation of mesenchymal stem cells. *Annals of the New York Academy of Sciences* 938, 231-233; discussion 233-235.
- Richardson, P.G., Barlogie, B., Berenson, J., Singhal, S., Jagannath, S., Irwin, D., Rajkumar, S.V., Srkalovic, G., Alsina, M., Alexanian, R., *et al.* (2003). A phase 2 study of bortezomib in relapsed, refractory myeloma. *The New England journal of medicine* 348, 2609-2617.
- Richardson, P.G., Briemberg, H., Jagannath, S., Wen, P.Y., Barlogie, B., Berenson, J., Singhal, S., Siegel, D.S., Irwin, D., Schuster, M., *et al.* (2006). Frequency, characteristics, and reversibility of peripheral neuropathy during treatment of advanced multiple myeloma with bortezomib. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* 24, 3113-3120.
- Richardson, P.G., Sonneveld, P., Schuster, M.W., Stadtmauer, E.A., Facon, T., Harousseau, J.L., Ben-Yehuda, D., Lonial, S., Goldschmidt, H., Reece, D., *et al.* (2009). Reversibility of symptomatic peripheral neuropathy with bortezomib in the phase III APEX trial in relapsed multiple myeloma: impact of a dose-modification guideline. *British journal of haematology* 144, 895-903.
- Robak, P., Drozd, I., Szemraj, J., and Robak, T. (2018). Drug resistance in multiple myeloma. *Cancer treatment reviews* 70, 199-208.
- Robinson R, Soames KH (1924). The possible significance of hexospheric esters in ossification Part II. The phosphoric esterase of ossifying cartilage. *Biochem J*; 18:740-754.
- Roccaro, A.M., Hideshima, T., Raje, N., Kumar, S., Ishitsuka, K., Yasui, H., Shiraishi, N., Ribatti, D., Nico, B., Vacca, A., *et al.* (2006). Bortezomib mediates antiangiogenesis in multiple myeloma via direct and indirect effects on endothelial cells. *Cancer research* 66, 184-191.
- Rock, K.L., Gramm, C., Rothstein, L., Clark, K., Stein, R., Dick, L., Hwang, D., and Goldberg, A.L. (1994). Inhibitors of the proteasome block the degradation of most cell proteins and the generation of peptides presented on MHC class I molecules. *Cell* 78, 761-771.
- Rosano, L., Di Castro, V., Spinella, F., Nicotra, M.R., Natali, P.G., and Bagnato, A. (2007). ZD4054, a specific antagonist of the endothelin A receptor, inhibits tumor growth and enhances paclitaxel activity in human ovarian carcinoma in vitro and in vivo. *Molecular cancer therapeutics* 6, 2003-2011.
- Rosano, L., Spinella, F., and Bagnato, A. (2013). Endothelin 1 in cancer: biological implications and therapeutic opportunities. *Nature reviews Cancer* 13, 637-651.
- Rosano, L., Spinella, F., Di Castro, V., Natali, P.G., and Bagnato, A. (2004). Therapeutic targeting of the endothelin-A receptor in human ovarian carcinoma: efficacy of cytotoxic agents is markedly enhanced by co-administration with atrasentan. *J Cardiovasc Pharmacol* 44 Suppl 1, S132-135.
- Ruckrich, T., Kraus, M., Gogel, J., Beck, A., Ovaa, H., Verdoes, M., Overkleeft, H.S., Kalbacher, H., and Driessen, C. (2009). Characterization of the ubiquitin-proteasome system in bortezomib-adapted cells. *Leukemia* 23, 1098-1105.

- Russignan, A., Spina, C., Tamassia, N., Cassaro, A., Rigo, A., Bagnato, A., Rosano, L., Bonalumi, A., Gottardi, M., Zanatta, L., *et al.* (2017). Endothelin-1 receptor blockade as new possible therapeutic approach in multiple myeloma. *British journal of haematology* *178*, 781-793.
- Saad, F., Lipton, A., Cook, R., Chen, Y.M., Smith, M., and Coleman, R. (2007). Pathologic fractures correlate with reduced survival in patients with malignant bone disease. *Cancer* *110*, 1860-1867.
- Sakamoto, A., Yanagisawa, M., Sakurai, T., Takuwa, Y., Yanagisawa, H., and Masaki, T. (1991). Cloning and functional expression of human cDNA for the ETB endothelin receptor. *Biochemical and biophysical research communications* *178*, 656-663.
- San Miguel, J., Blade, J., Boccadoro, M., Cavenagh, J., Glasmacher, A., Jagannath, S., Lonial, S., Orłowski, R.Z., Sonneveld, P., and Ludwig, H. (2006). A practical update on the use of bortezomib in the management of multiple myeloma. *The oncologist* *11*, 51-61.
- San Miguel, J.F., Schlag, R., Khuageva, N.K., Dimopoulos, M.A., Shpilberg, O., Kropff, M., Spicka, I., Petrucci, M.T., Palumbo, A., Samoilova, O.S., *et al.* (2008). Bortezomib plus melphalan and prednisone for initial treatment of multiple myeloma. *The New England journal of medicine* *359*, 906-917.
- Satoh, K., Sasajima, H., Nyomura, K.I., Yokosawa, H., and Sawada, H. (2001). Assembly of the 26S proteasome is regulated by phosphorylation of the p45/Rpt6 ATPase subunit. *Biochemistry* *40*, 314-319.
- Schafer, J., Welti, L., Seckinger, A., Burhenne, J., Theile, D., and Weiss, J. (2017). Cellular effect and efficacy of carfilzomib depends on cellular net concentration gradient. *Cancer chemotherapy and pharmacology* *80*, 71-79.
- Schaffler, M.B., and Kennedy, O.D. (2012). Osteocyte signaling in bone. *Curr Osteoporos Rep* *10*, 118-125.
- Scheid, C., Sonneveld, P., Schmidt-Wolf, I.G., van der Holt, B., el Jarari, L., Bertsch, U., Salwender, H., Zweegman, S., Blau, I.W., Vellenga, E., *et al.* (2014). Bortezomib before and after autologous stem cell transplantation overcomes the negative prognostic impact of renal impairment in newly diagnosed multiple myeloma: a subgroup analysis from the HOVON-65/GMMG-HD4 trial. *Haematologica* *99*, 148-154.
- Schelman, W.R., Traynor, A.M., Holen, K.D., Kolesar, J.M., Attia, S., Hoang, T., Eickhoff, J., Jiang, Z., Alberti, D., Marnocha, R., *et al.* (2013). A phase I study of vorinostat in combination with bortezomib in patients with advanced malignancies. *Investigational new drugs* *31*, 1539-1546.
- Schenk, E., Hendrickson, A.E., Northfelt, D., Toft, D.O., Ames, M.M., Menefee, M., Satele, D., Qin, R., and Erlichman, C. (2013). Phase I study of tanespimycin in combination with bortezomib in patients with advanced solid malignancies. *Investigational new drugs* *31*, 1251-1256.
- Schmidmaier, R., Morsdorf, K., Baumann, P., Emmerich, B., and Meinhardt, G. (2006). Evidence for cell adhesion-mediated drug resistance of multiple myeloma cells in vivo. *Int J Biol Markers* *21*, 218-222.
- Schwartz, R., and Davidson, T. (2004). Pharmacology, pharmacokinetics, and practical applications of bortezomib. *Oncology* *18*, 14-21.
- Seckinger, A., Delgado, J.A., Moser, S., Moreno, L., Neuber, B., Grab, A., Lipp, S., Merino, J., Prosper, F., Emde, M., *et al.* (2017). Target Expression, Generation, Preclinical Activity, and Pharmacokinetics

of the BCMA-T Cell Bispecific Antibody EM801 for Multiple Myeloma Treatment. *Cancer cell* **31**, 396-410.

Seckinger, A., Meissner, T., Moreaux, J., Benes, V., Hillengass, J., Castoldi, M., Zimmermann, J., Ho, A.D., Jauch, A., Goldschmidt, H., *et al.* (2015). miRNAs in multiple myeloma--a survival relevant complex regulator of gene expression. *Oncotarget* **6**, 39165-39183.

Seckinger, A., Meissner, T., Moreaux, J., Goldschmidt, H., Fuhler, G.M., Benner, A., Hundemer, M., Reme, T., Shaughnessy, J.D., Jr., Barlogie, B., *et al.* (2009). Bone morphogenetic protein 6: a member of a novel class of prognostic factors expressed by normal and malignant plasma cells inhibiting proliferation and angiogenesis. *Oncogene* **28**, 3866-3879.

Seemuller, E., Lupas, A., Stock, D., Lowe, J., Huber, R., and Baumeister, W. (1995). Proteasome from *Thermoplasma acidophilum*: a threonine protease. *Science* **268**, 579-582.

Seidel, C., Hjertner, O., Abildgaard, N., Heickendorff, L., Hjorth, M., Westin, J., Nielsen, J.L., Hjorth-Hansen, H., Waage, A., Sundan, A., *et al.* (2001). Serum osteoprotegerin levels are reduced in patients with multiple myeloma with lytic bone disease. *Blood* **98**, 2269-2271.

Seifert, U., Bialy, L.P., Ebstein, F., Bech-Otschir, D., Voigt, A., Schroter, F., Prozorovski, T., Lange, N., Steffen, J., Rieger, M., *et al.* (2010). Immunoproteasomes preserve protein homeostasis upon interferon-induced oxidative stress. *Cell* **142**, 613-624.

Sekiya, I., Larson, B.L., Smith, J.R., Pochampally, R., Cui, J.G., and Prockop, D.J. (2002). Expansion of human adult stem cells from bone marrow stroma: conditions that maximize the yields of early progenitors and evaluate their quality. *Stem cells* **20**, 530-541.

Sezer, O., Beksac, M., Hajek, R., Sucak, G., Cagiran, S., Linkesch, W., Meltem Akay, O., Gulbas, Z., Nahi, H., Plesner, T., *et al.* (2017). Effects of single-agent bortezomib as post-transplant consolidation therapy on multiple myeloma-related bone disease: a randomized phase II study. *British journal of haematology* **178**, 61-71.

Shabaneh, T.B., Downey, S.L., Goddard, A.L., Screen, M., Lucas, M.M., Eastman, A., and Kisselev, A.F. (2013). Molecular basis of differential sensitivity of myeloma cells to clinically relevant bolus treatment with bortezomib. *PloS one* **8**, e56132.

Shah, S.P., Lonial, S., and Boise, L.H. (2015). When Cancer Fights Back: Multiple Myeloma, Proteasome Inhibition, and the Heat-Shock Response. *Molecular cancer research : MCR* **13**, 1163-1173.

Sharma, A., Tripathi, M., Satyam, A., and Kumar, L. (2009). Study of antioxidant levels in patients with multiple myeloma. *Leukemia & lymphoma* **50**, 809-815.

Sharon, M., Witt, S., Felderer, K., Rockel, B., Baumeister, W., and Robinson, C.V. (2006). 20S proteasomes have the potential to keep substrates in store for continual degradation. *The Journal of biological chemistry* **281**, 9569-9575.

Shi, D.S., Smith, M.C., Campbell, R.A., Zimmerman, P.W., Franks, Z.B., Kraemer, B.F., Machlus, K.R., Ling, J., Kamba, P., Schwertz, H., *et al.* (2014). Proteasome function is required for platelet production. *The Journal of clinical investigation* **124**, 3757-3766.

Siegel, D.S., Dimopoulos, M.A., Ludwig, H., Facon, T., Goldschmidt, H., Jakubowiak, A., San-Miguel, J., Obreja, M., Blaedel, J., and Stewart, A.K. (2018a). Improvement in Overall Survival With Carfilzomib,

Lenalidomide, and Dexamethasone in Patients With Relapsed or Refractory Multiple Myeloma. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* 36, 728-734.

Siegel, D.S., Martin, T., Wang, M., Vij, R., Jakubowiak, A.J., Lonial, S., Trudel, S., Kukreti, V., Bahlis, N., Alsina, M., *et al.* (2012). A phase 2 study of single-agent carfilzomib (PX-171-003-A1) in patients with relapsed and refractory multiple myeloma. *Blood* 120, 2817-2825.

Siegel, R.L., Miller, K.D., and Jemal, A. (2018b). Cancer statistics, 2018. *CA: a cancer journal for clinicians* 68, 7-30.

Singh, A.V., Bandi, M., Aujay, M.A., Kirk, C.J., Hark, D.E., Raje, N., Chauhan, D., and Anderson, K.C. (2011). PR-924, a selective inhibitor of the immunoproteasome subunit LMP-7, blocks multiple myeloma cell growth both in vitro and in vivo. *British journal of haematology* 152, 155-163.

Smirnova, O.V., Titova, N.M., and Elmanova, N.G. (2014). The relationship between the pro-oxidant and antioxidant system status of patients with multiple myeloma and the disease stage. *Bulletin of experimental biology and medicine* 157, 375-379.

Sonneveld, P., Schmidt-Wolf, I.G., van der Holt, B., El Jarari, L., Bertsch, U., Salwender, H., Zweegman, S., Vellenga, E., Broyl, A., Blau, I.W., *et al.* (2012). Bortezomib induction and maintenance treatment in patients with newly diagnosed multiple myeloma: results of the randomized phase III HOVON-65/ GMMG-HD4 trial. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* 30, 2946-2955.

Sotiropoulou, P.A., Perez, S.A., Salagianni, M., Baxevanis, C.N., and Papamichail, M. (2006). Cell culture medium composition and translational adult bone marrow-derived stem cell research. *Stem cells* 24, 1409-1410.

Spencer, A., Harrison, S., Zonder, J., Badros, A., Laubach, J., Bergin, K., Khot, A., Zimmerman, T., Chauhan, D., Levin, N., *et al.* (2018). A phase 1 clinical trial evaluating marizomib, pomalidomide and low-dose dexamethasone in relapsed and refractory multiple myeloma (NPI-0052-107): final study results. *British journal of haematology* 180, 41-51.

Spinella, F., Caprara, V., Cianfrocca, R., Rosano, L., Di Castro, V., Garrafa, E., Natali, P.G., and Bagnato, A. (2014). The interplay between hypoxia, endothelial and melanoma cells regulates vascularization and cell motility through endothelin-1 and vascular endothelial growth factor. *Carcinogenesis* 35, 840-848.

Spisek, R., Charalambous, A., Mazumder, A., Vesole, D.H., Jagannath, S., and Dhodapkar, M.V. (2007). Bortezomib enhances dendritic cell (DC)-mediated induction of immunity to human myeloma via exposure of cell surface heat shock protein 90 on dying tumor cells: therapeutic implications. *Blood* 109, 4839-4845.

Stenderup, K., Justesen, J., Clausen, C., and Kassem, M. (2003). Aging is associated with decreased maximal life span and accelerated senescence of bone marrow stromal cells. *Bone* 33, 919-926.

Stock, C.J. (1991). Endodontics in the UK 1990: an overview. *International endodontic journal* 24, 148-154.

Stratogianni, A., Tosch, M., Schlemmer, H., Weis, J., Katona, I., Isenmann, S., and Haensch, C.A. (2012). Bortezomib-induced severe autonomic neuropathy. *Clin Auton Res* 22, 199-202.

Sun, X.M., Butterworth, M., MacFarlane, M., Dubiel, W., Ciechanover, A., and Cohen, G.M. (2004). Caspase activation inhibits proteasome function during apoptosis. *Molecular cell* 14, 81-93.

- Sviland, L., Leggat, H., Harris, A.L., Bird, G., and Proctor, S.J. (1987). Short course intermediate dose intravenous melphalan therapy in myeloma--relation to early emergence of drug resistance (phase II study). *Acta haematologica* 78, 233-238.
- Takeuchi, K., Abe, M., Hiasa, M., Oda, A., Amou, H., Kido, S., Harada, T., Tanaka, O., Miki, H., Nakamura, S., *et al.* (2010). Tgf-Beta inhibition restores terminal osteoblast differentiation to suppress myeloma growth. *PLoS one* 5, e9870.
- Tan, C.R.C., Abdul-Majeed, S., Cael, B., and Barta, S.K. (2018). Clinical Pharmacokinetics and Pharmacodynamics of Bortezomib. *Clinical pharmacokinetics*.
- Tanaka, K. (2009). The proteasome: overview of structure and functions. *Proc Jpn Acad Ser B Phys Biol Sci* 85, 12-36.
- Tanaka, Y., Abe, M., Hiasa, M., Oda, A., Amou, H., Nakano, A., Takeuchi, K., Kitazoe, K., Kido, S., Inoue, D., *et al.* (2007). Myeloma cell-osteoclast interaction enhances angiogenesis together with bone resorption: a role for vascular endothelial cell growth factor and osteopontin. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* 13, 816-823.
- Tarte, K., De Vos, J., Thykjaer, T., Zhan, F., Fiol, G., Costes, V., Reme, T., Legouffe, E., Rossi, J.F., Shaughnessy, J., Jr., *et al.* (2002). Generation of polyclonal plasmablasts from peripheral blood B cells: a normal counterpart of malignant plasmablasts. *Blood* 100, 1113-1122.
- Terpos, E., Christoulas, D., and Gavriatopoulou, M. (2018a). Biology and treatment of myeloma related bone disease. *Metabolism: clinical and experimental* 80, 80-90.
- Terpos, E., Christoulas, D., Kokkoris, P., Anargyrou, K., Gavriatopoulou, M., Migkou, M., Tsionos, K., and Dimopoulos, M.A. (2010). Increased bone mineral density in a subset of patients with relapsed multiple myeloma who received the combination of bortezomib, dexamethasone and zoledronic acid. *Annals of oncology : official journal of the European Society for Medical Oncology / ESMO* 21, 1561-1562.
- Terpos, E., and Dimopoulos, M.A. (2005). Myeloma bone disease: pathophysiology and management. *Annals of oncology : official journal of the European Society for Medical Oncology / ESMO* 16, 1223-1231.
- Terpos, E., Heath, D.J., Rahemtulla, A., Zervas, K., Chantry, A., Anagnostopoulos, A., Pouli, A., Katodritou, E., Verrou, E., Vervessou, E.C., *et al.* (2006). Bortezomib reduces serum dickkopf-1 and receptor activator of nuclear factor-kappaB ligand concentrations and normalises indices of bone remodelling in patients with relapsed multiple myeloma. *British journal of haematology* 135, 688-692.
- Terpos, E., Ntanasis-Stathopoulos, I., Gavriatopoulou, M., and Dimopoulos, M.A. (2018b). Pathogenesis of bone disease in multiple myeloma: from bench to bedside. *Blood cancer journal* 8, 7.
- Terpos, E., Politou, M., and Rahemtulla, A. (2003a). New insights into the pathophysiology and management of bone disease in multiple myeloma. *British journal of haematology* 123, 758-769.
- Terpos, E., Sezer, O., Croucher, P., and Dimopoulos, M.A. (2007). Myeloma bone disease and proteasome inhibition therapies. *Blood* 110, 1098-1104.
- Terpos, E., Szydlo, R., Apperley, J.F., Hatjiharissi, E., Politou, M., Meletis, J., Viniou, N., Yataganas, X., Goldman, J.M., and Rahemtulla, A. (2003b). Soluble receptor activator of nuclear factor kappaB

ligand-osteoprotegerin ratio predicts survival in multiple myeloma: proposal for a novel prognostic index. *Blood* 102, 1064-1069.

Thrower, J.S., Hoffman, L., Rechsteiner, M., and Pickart, C.M. (2000). Recognition of the polyubiquitin proteolytic signal. *The EMBO journal* 19, 94-102.

Tian, E., Zhan, F., Walker, R., Rasmussen, E., Ma, Y., Barlogie, B., and Shaughnessy, J.D., Jr. (2003). The role of the Wnt-signaling antagonist DKK1 in the development of osteolytic lesions in multiple myeloma. *The New England journal of medicine* 349, 2483-2494.

Tomko, R.J., Jr., and Hochstrasser, M. (2013). Molecular architecture and assembly of the eukaryotic proteasome. *Annual review of biochemistry* 82, 415-445.

Toscani, D., Palumbo, C., Dalla Palma, B., Ferretti, M., Bolzoni, M., Marchica, V., Sena, P., Martella, E., Mancini, C., Ferri, V., *et al.* (2016). The Proteasome Inhibitor Bortezomib Maintains Osteocyte Viability in Multiple Myeloma Patients by Reducing Both Apoptosis and Autophagy: A New Function for Proteasome Inhibitors. *Journal of bone and mineral research : the official journal of the American Society for Bone and Mineral Research* 31, 815-827.

Traenckner, E.B., Wilk, S., and Baeuerle, P.A. (1994). A proteasome inhibitor prevents activation of NF-kappa B and stabilizes a newly phosphorylated form of I kappa B-alpha that is still bound to NF-kappa B. *The EMBO journal* 13, 5433-5441.

Treiber, A., Schneider, R., Hausler, S., and Stieger, B. (2007). Bosentan is a substrate of human OATP1B1 and OATP1B3: inhibition of hepatic uptake as the common mechanism of its interactions with cyclosporin A, rifampicin, and sildenafil. *Drug metabolism and disposition: the biological fate of chemicals* 35, 1400-1407.

Ungar-Waron, H., Braverman, Y., Gluckman, A., and Trainin, Z. (1990). Immunogenicity and allergenicity of *Culicoides imicola* (Diptera: Ceratopogonidae) extracts. *Zentralbl Veterinarmed B* 37, 64-72.

Unno, M., Mizushima, T., Morimoto, Y., Tomisugi, Y., Tanaka, K., Yasuoka, N., and Tsukihara, T. (2002). The structure of the mammalian 20S proteasome at 2.75 Å resolution. *Structure* 10, 609-618.

Uttamsingh, V., Lu, C., Miwa, G., and Gan, L.S. (2005). Relative contributions of the five major human cytochromes P450, 1A2, 2C9, 2C19, 2D6, and 3A4, to the hepatic metabolism of the proteasome inhibitor bortezomib. *Drug metabolism and disposition: the biological fate of chemicals* 33, 1723-1728.

Vaiou, M., Pangou, E., Liakos, P., Sakellaris, N., Vassilopoulos, G., Dimas, K., and Papandreou, C. (2016). Endothelin-1 (ET-1) induces resistance to bortezomib in human multiple myeloma cells via a pathway involving the ETB receptor and upregulation of proteasomal activity. *Journal of cancer research and clinical oncology* 142, 2141-2158.

van Rhee, F., Szymonifka, J., Anaissie, E., Nair, B., Waheed, S., Alsayed, Y., Petty, N., Shaughnessy, J.D., Jr., Hoering, A., Crowley, J., *et al.* (2010). Total Therapy 3 for multiple myeloma: prognostic implications of cumulative dosing and premature discontinuation of VTD maintenance components, bortezomib, thalidomide, and dexamethasone, relevant to all phases of therapy. *Blood* 116, 1220-1227.

- van Wijk, S.J., and Timmers, H.T. (2010). The family of ubiquitin-conjugating enzymes (E2s): deciding between life and death of proteins. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 24, 981-993.
- Vandesompele, J., De Preter, K., Pattyn, F., Poppe, B., Van Roy, N., De Paepe, A., and Speleman, F. (2002). Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. *Genome biology* 3, RESEARCH0034.
- Verbrugge, S.E., Assaraf, Y.G., Dijkmans, B.A., Scheffer, G.L., Al, M., den Uyl, D., Oerlemans, R., Chan, E.T., Kirk, C.J., Peters, G.J., *et al.* (2012). Inactivating PSMB5 mutations and P-glycoprotein (multidrug resistance-associated protein/ATP-binding cassette B1) mediate resistance to proteasome inhibitors: ex vivo efficacy of (immuno)proteasome inhibitors in mononuclear blood cells from patients with rheumatoid arthritis. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics* 341, 174-182.
- VerPlank, J.J.S., and Goldberg, A.L. (2017). Regulating protein breakdown through proteasome phosphorylation. *The Biochemical journal* 474, 3355-3371.
- Vogel, W., Grunebach, F., Messam, C.A., Kanz, L., Brugger, W., and Buhning, H.J. (2003). Heterogeneity among human bone marrow-derived mesenchymal stem cells and neural progenitor cells. *Haematologica* 88, 126-133.
- Voorhees, P.M., Chen, Q., Kuhn, D.J., Small, G.W., Hunsucker, S.A., Strader, J.S., Corringham, R.E., Zaki, M.H., Nemeth, J.A., and Orlowski, R.Z. (2007). Inhibition of interleukin-6 signaling with CNTO 328 enhances the activity of bortezomib in preclinical models of multiple myeloma. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* 13, 6469-6478.
- Wagner, W., Wein, F., Seckinger, A., Frankhauser, M., Wirkner, U., Krause, U., Blake, J., Schwager, C., Eckstein, V., Ansorge, W., *et al.* (2005). Comparative characteristics of mesenchymal stem cells from human bone marrow, adipose tissue, and umbilical cord blood. *Experimental hematology* 33, 1402-1416.
- Walker, B.A., Wardell, C.P., Chiecchio, L., Smith, E.M., Boyd, K.D., Neri, A., Davies, F.E., Ross, F.M., and Morgan, G.J. (2011). Aberrant global methylation patterns affect the molecular pathogenesis and prognosis of multiple myeloma. *Blood* 117, 553-562.
- Walker, D.G. (1975). Control of bone resorption by hematopoietic tissue. The induction and reversal of congenital osteopetrosis in mice through use of bone marrow and splenic transplants. *The Journal of experimental medicine* 142, 651-663.
- Walker, R., Barlogie, B., Haessler, J., Tricot, G., Anaissie, E., Shaughnessy, J.D., Jr., Epstein, J., van Hemert, R., Erdem, E., Hoering, A., *et al.* (2007). Magnetic resonance imaging in multiple myeloma: diagnostic and clinical implications. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* 25, 1121-1128.
- Wallace, S.R., Oken, M.M., Lunetta, K.L., Panoskaltsis-Mortari, A., and Masellis, A.M. (2001). Abnormalities of bone marrow mesenchymal cells in multiple myeloma patients. *Cancer* 91, 1219-1230.
- Wang, D., Fang, C., Zong, N.C., Liem, D.A., Cadeiras, M., Scruggs, S.B., Yu, H., Kim, A.K., Yang, P., Deng, M., *et al.* (2013). Regulation of acetylation restores proteolytic function of diseased myocardium in mouse and human. *Mol Cell Proteomics* 12, 3793-3802.

- Wang, J., Hendrix, A., Hernot, S., Lemaire, M., De Bruyne, E., Van Valckenborgh, E., Lahoutte, T., De Wever, O., Vanderkerken, K., and Menu, E. (2014). Bone marrow stromal cell-derived exosomes as communicators in drug resistance in multiple myeloma cells. *Blood* 124, 555-566.
- Wang, J.F., Wang, L.J., Wu, Y.F., Xiang, Y., Xie, C.G., Jia, B.B., Harrington, J., and McNiece, I.K. (2004). Mesenchymal stem/progenitor cells in human umbilical cord blood as support for ex vivo expansion of CD34(+) hematopoietic stem cells and for chondrogenic differentiation. *Haematologica* 89, 837-844.
- Warren P, Taylor D, Martini PGV, Jackson J, Bienkowska J (2007). PANP-a New Method of Gene Detection on Oligonucleotide Expression Arrays. *Proceedings of the 7th IEEE International Conference on Bioinformatics and Bioengineering*, 108-115.
- Wilkinson, K.D. (2005). The discovery of ubiquitin-dependent proteolysis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 102, 15280-15282.
- Wu Z., Irizarry R.A., Gentleman R., Martinez-Murillo F., Spencer F. (2004). A Model-Based Background Adjustment for Oligonucleotide Expression Arrays. *J Am Stat Assoc* 99:909-917.
- Wulfing, C., Eltze, E., Yamini, J., Wulfing, P., Bierer, S., Bocker, W., Hertle, L., Semjonow, A., and Sievert, K.D. (2005). Expression of the endothelin axis in bladder cancer: relationship to clinicopathologic parameters and long-term survival. *European urology* 47, 593-600.
- Xiao, W., Wang, Y., Pacios, S., Li, S., and Graves, D.T. (2016). Cellular and Molecular Aspects of Bone Remodeling. *Front Oral Biol* 18, 9-16.
- Xu, Q., Farah, M., Webster, J.M., and Wojcikiewicz, R.J. (2004). Bortezomib rapidly suppresses ubiquitin thiolesterification to ubiquitin-conjugating enzymes and inhibits ubiquitination of histones and type I inositol 1,4,5-trisphosphate receptor. *Molecular cancer therapeutics* 3, 1263-1269.
- Yanagisawa, M., Kurihara, H., Kimura, S., Tomobe, Y., Kobayashi, M., Mitsui, Y., Yazaki, Y., Goto, K., and Masaki, T. (1988). A novel potent vasoconstrictor peptide produced by vascular endothelial cells. *Nature* 332, 411-415.
- Zangari, M., Esseltine, D., Lee, C.K., Barlogie, B., Elice, F., Burns, M.J., Kang, S.H., Yaccoby, S., Najarian, K., Richardson, P., *et al.* (2005). Response to bortezomib is associated to osteoblastic activation in patients with multiple myeloma. *British journal of haematology* 131, 71-73.
- Zangari, M., and Suva, L.J. (2016). The effects of proteasome inhibitors on bone remodeling in multiple myeloma. *Bone* 86, 131-138.
- Zangari, M., Yaccoby, S., Pappas, L., Cavallo, F., Kumar, N.S., Ranganathan, S., Suva, L.J., Gruenwald, J.M., Kern, S., Zhan, F., *et al.* (2011). A prospective evaluation of the biochemical, metabolic, hormonal and structural bone changes associated with bortezomib response in multiple myeloma patients. *Haematologica* 96, 333-336.
- Zavrski, I., Jakob, C., Schmid, P., Krebbel, H., Kaiser, M., Fleissner, C., Rosche, M., Possinger, K., and Sezer, O. (2005). Proteasome: an emerging target for cancer therapy. *Anti-cancer drugs* 16, 475-481.
- Zhang, W., Wang, Y.E., Zhang, Y., Leleu, X., Reagan, M., Zhang, Y., Mishima, Y., Glavey, S., Manier, S., Sacco, A., *et al.* (2014). Global epigenetic regulation of microRNAs in multiple myeloma. *PloS one* 9, e110973.

Zhang, X., Yang, M., Lin, L., Chen, P., Ma, K.T., Zhou, C.Y., and Ao, Y.F. (2006). Runx2 overexpression enhances osteoblastic differentiation and mineralization in adipose--derived stem cells in vitro and in vivo. *Calcified tissue international* 79, 169-178.

Zhang, Y., and Manning, B.D. (2015). mTORC1 signaling activates NRF1 to increase cellular proteasome levels. *Cell cycle* 14, 2011-2017.

Zinszner, H., Kuroda, M., Wang, X., Batchvarova, N., Lightfoot, R.T., Remotti, H., Stevens, J.L., and Ron, D. (1998). CHOP is implicated in programmed cell death in response to impaired function of the endoplasmic reticulum. *Genes & development* 12, 982-995.

Zisowsky, J., Koegel, S., Leyers, S., Devarakonda, K., Kassack, M.U., Osmak, M., and Jaehde, U. (2007). Relevance of drug uptake and efflux for cisplatin sensitivity of tumor cells. *Biochemical pharmacology* 73, 298-307.

Zweegman, S., van der Holt, B., Mellqvist, U.H., Salomo, M., Bos, G.M., Levin, M.D., Visser-Wisselaar, H., Hansson, M., van der Velden, A.W., Deenik, W., *et al.* (2016). Melphalan, prednisone, and lenalidomide versus melphalan, prednisone, and thalidomide in untreated multiple myeloma. *Blood* 127, 1109-1116.

7. Anhang

7.1 Einfluss von Bortezomib auf die Zellviabilität von MSC und Osteoblasten

7.1.1 Sensitivität von MSC gegenüber Bortezomib nach 48 h Expositionszeit

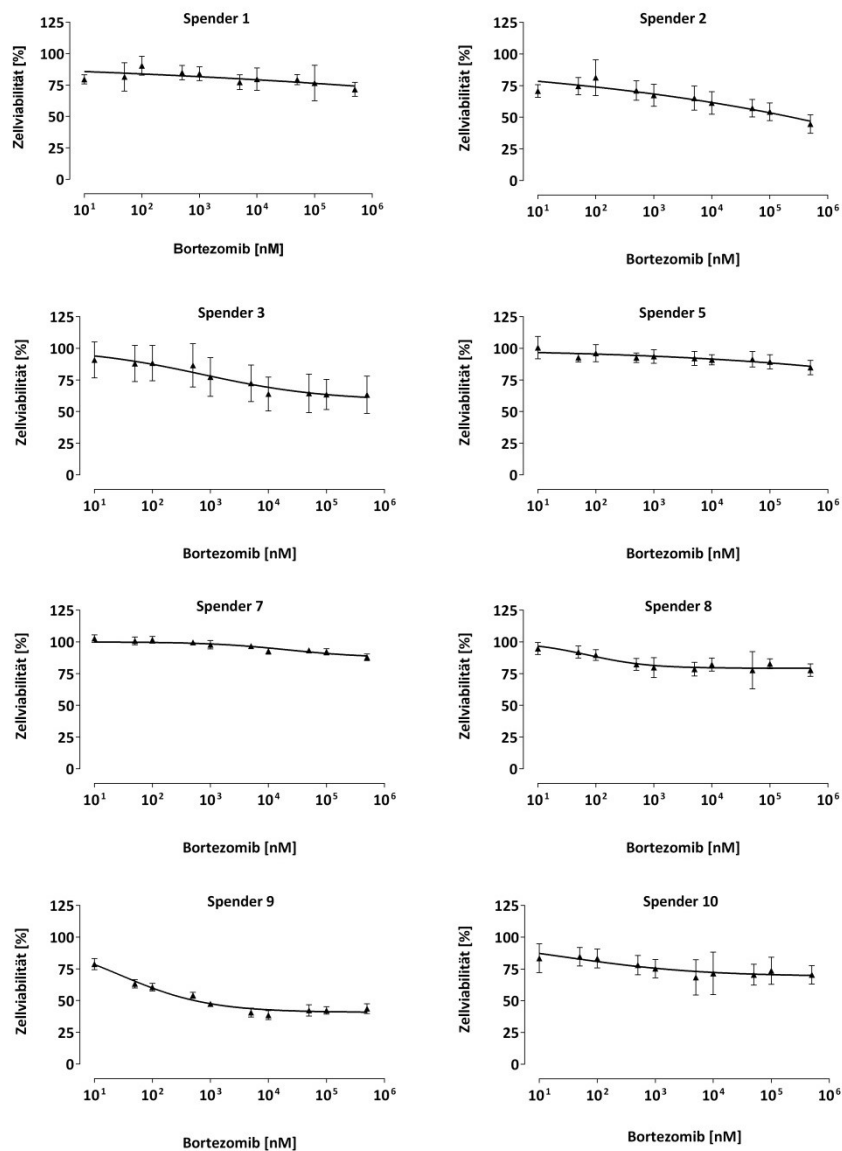


Abbildung A.1: Konzentrations-abhängiger Einfluss von Bortezomib auf die Zellviabilität [%] von mesenchymalen Stromazellen (*mesenchymal stromal cells*, MSC) gesunder Normalspender nach 48 h Exposition. Die MSC ($n = 8$) wurden für 48 h mit 0,01-500 μM Bortezomib exponiert. Die gezeigten Daten entsprechen dem Mittelwert \pm Standardabweichung von $n = 24$ Einzelwerten (3 biologische Replikate; jede Konzentration in 8 technischen Replikaten).

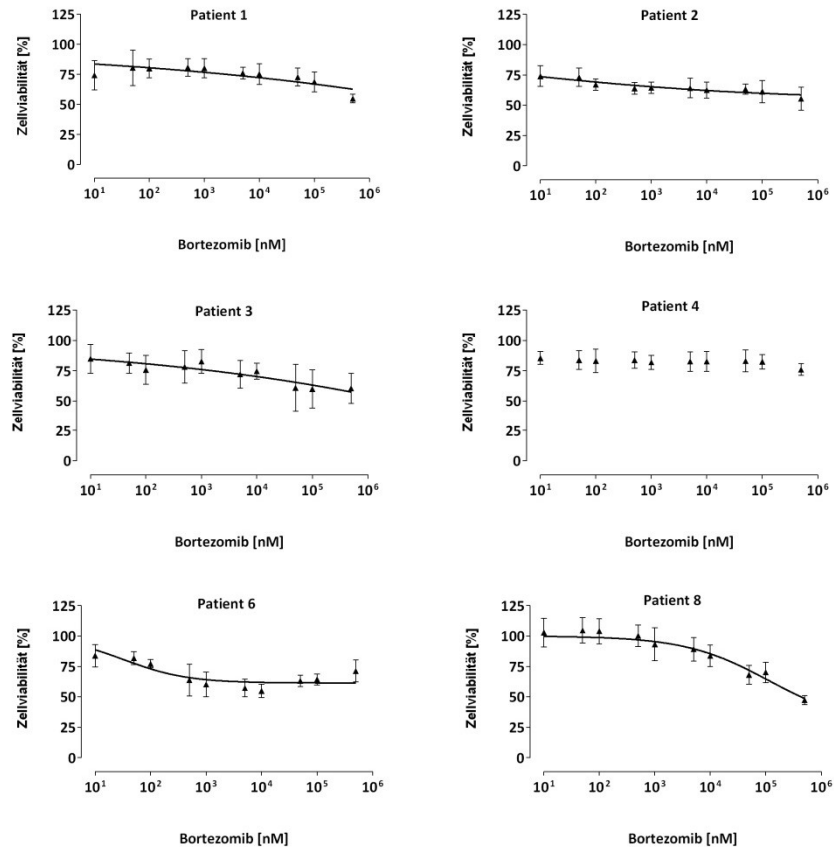


Abbildung A.2: Konzentrations-abhängiger Einfluss von Bortezomib auf die Zellviabilität [%] von mesenchymalen Stromazellen (*mesenchymal stromal cells*, MSC) von Patienten mit Multiplem Myelom nach 48 h Exposition. Die MSC (n = 8) wurden für 48 h mit 0,01-500 μ M Bortezomib exponiert. Die gezeigten Daten entsprechen dem Mittelwert \pm Standardabweichung von n = 24 Einzelwerten (3 biologische Replikate; jede Konzentration in 8 technischen Replikaten).

7.1.2 Sensitivität von Osteoblasten gegenüber Bortezomib nach 48 h Exposition

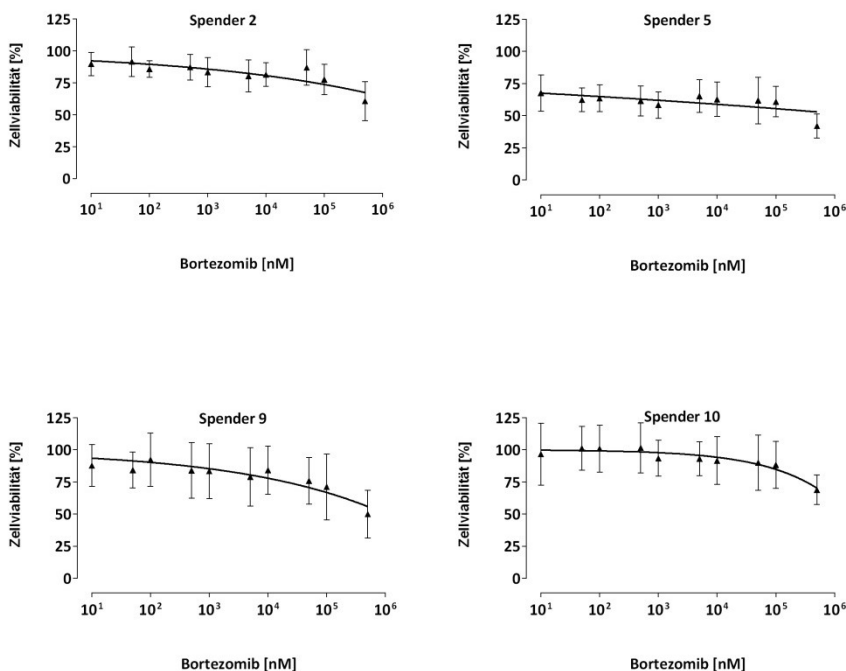


Abbildung A.3: Konzentrations-abhängiger Einfluss von Bortezomib auf die Zellviabilität [%] von Osteoblasten gesunder Spender nach 48 h Exposition. Die Osteoblasten (n = 4) wurden für 48 h mit 0,01-500 μ M Bortezomib exponiert. Die gezeigten Daten entsprechen dem Mittelwert \pm Standardabweichung von n = 24 Einzelwerten (3 biologische Replikate; jede Konzentration in 8 technischen Replikaten).

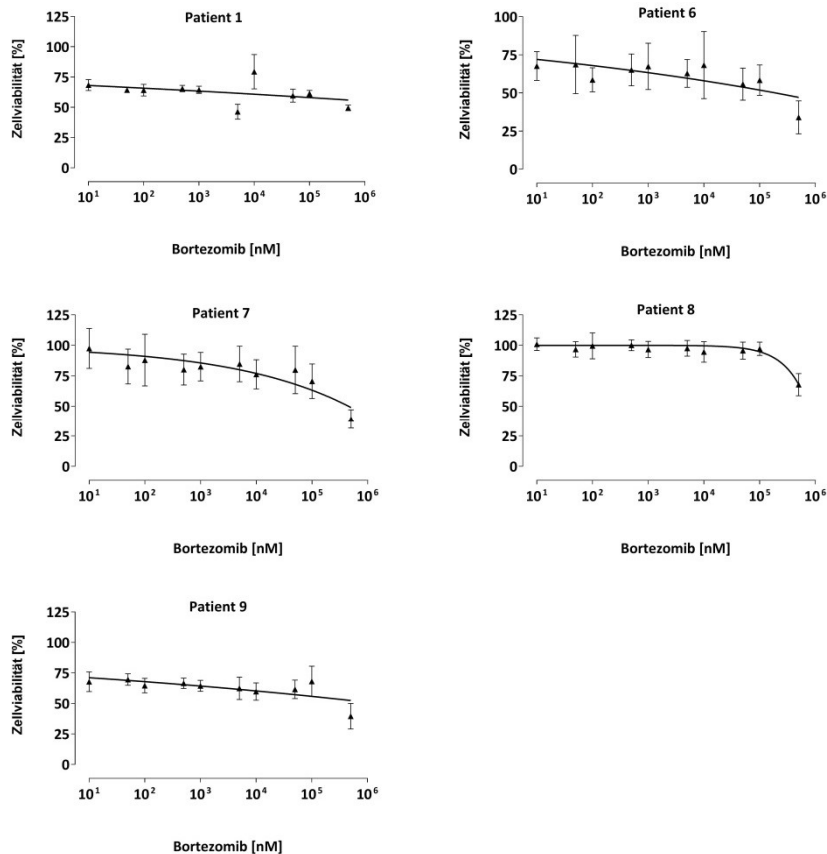
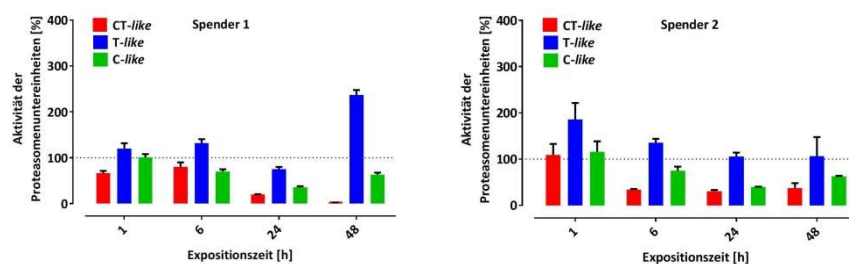


Abbildung A.4: Konzentrations-abhängiger Einfluss von Bortezomib auf die Zellviabilität [%] der Osteoblasten von Patienten mit Multiplem Myelom nach 48 h Exposition. Die Osteoblasten (n = 5) wurden für 48 h mit 0,01-500 μ M Bortezomib exponiert. Die gezeigten Daten entsprechen dem Mittelwert \pm Standardabweichung von n = 24 Einzelwerten (3 biologische Replikate; jede Konzentration in 8 technischen Replikaten).

7.2 Einfluss von Bortezomib auf die Aktivität der drei Proteasomenuntereinheiten von MSC und Osteoblasten

7.2.1 Einfluss der Expositionsdauer von 5 nM Bortezomib auf die Aktivität der Proteasomenuntereinheiten in MSC von Normal Spendern und Patienten



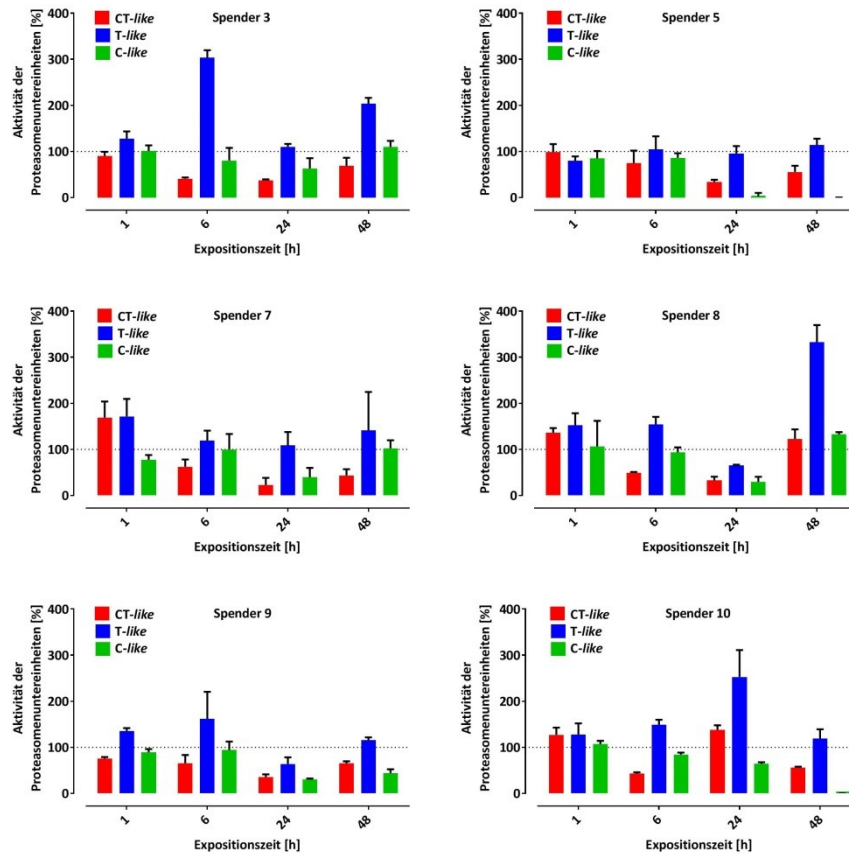
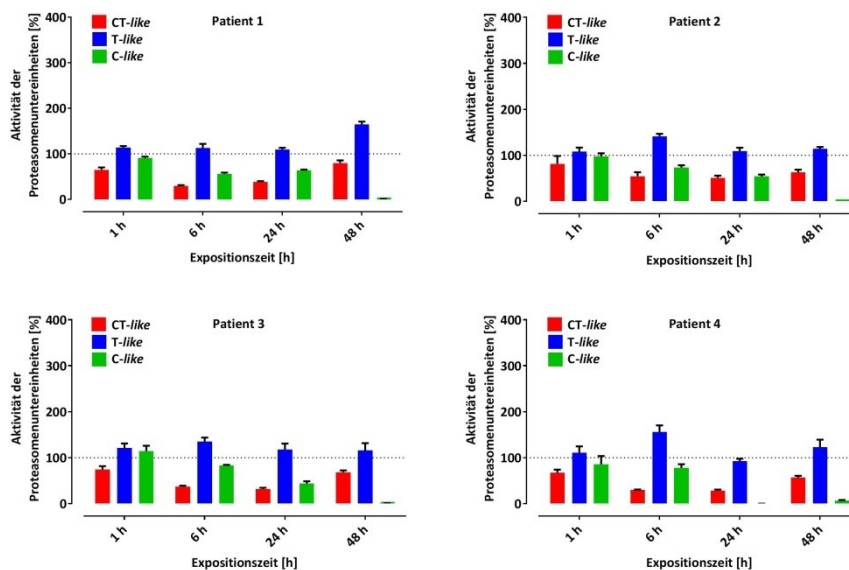


Abbildung A.5: Expositionszeit-abhängige Inhibition der Aktivität katalytischen Proteasomenuntereinheiten [%] in mesenchymalen Stromazellen (*mesenchymal stromal cells*, MSC) von Normal Spendern. Mittlere Inhibition \pm Standardabweichung der CT-, T- und C-like Proteasomenaktivität in MSC von Normal Spendern ($n = 8$) nach 1 h, 6 h, 24 h und 48 h Exposition mit 5 nM Bortezomib. Unabhängig von ihrem Ursprung zeigten die MSC im Mittel eine Expositionszeit-abhängige potente Reduktion der CT-like Proteasomenaktivität durch Bortezomib. Eine kompensatorische Gegenregulation der T-like Proteasomenuntereinheit wurde beobachtet (100 % Aktivität der Proteasomenuntereinheiten = gestrichelte Linie). Insgesamt sind starke interindividuelle Schwankungen zu beobachten.



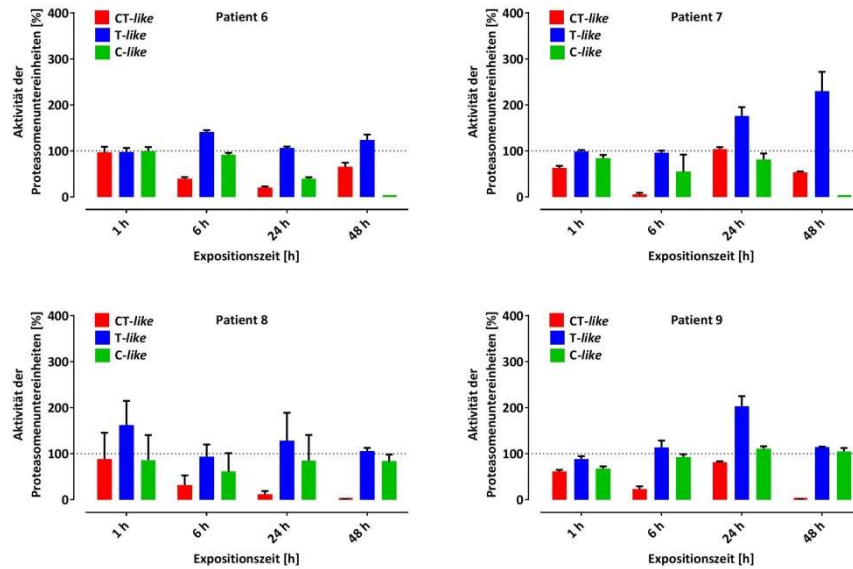
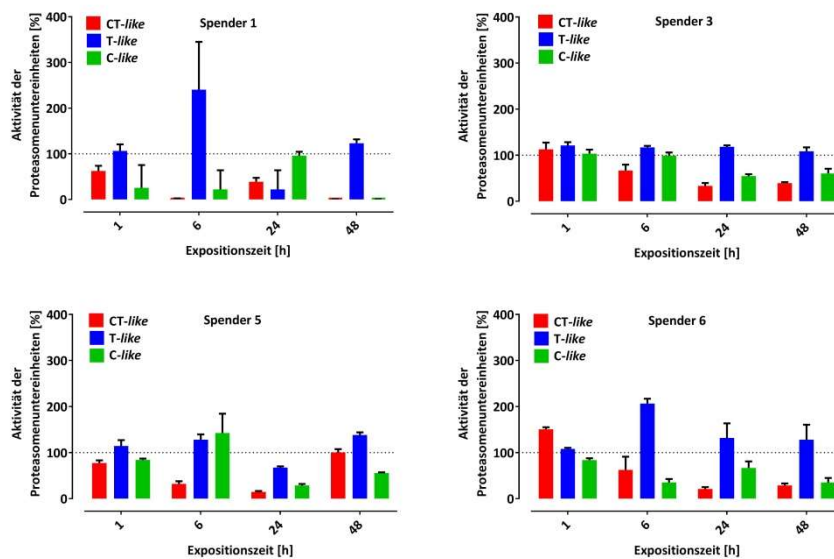


Abbildung A.6: Expositionszeit-abhängige Inhibition der Aktivität katalytischen Proteasomenuntereinheiten [%] in mesenchymalen Stromazellen (*mesenchymal stromal cells*, MSC) von Patienten. Mittlere Inhibition \pm Standardabweichung der CT-, T- und C-like Proteasomenaktivität in MSC von Patienten mit Multiplen Myelom ($n = 8$) nach 1 h, 6 h, 24 h und 48 h Exposition mit 5 nM Bortezomib. Die MSC zeigten im Mittel eine Expositionszeit-abhängige potente Reduktion der CT-like Proteasomenaktivität durch Bortezomib. Eine kompensatorische Gegenregulation der T-like Proteasomenuntereinheit wurde beobachtet (100 % Aktivität der Proteasomenuntereinheiten = gestrichelte Linie). Insgesamt sind starke interindividuelle Schwankungen zu beobachten.

7.2.2 Einfluss der Expositionsdauer von 5 nM Bortezomib auf die Aktivität der Proteasomenuntereinheiten in Osteoblasten von Normalspendern und Patienten



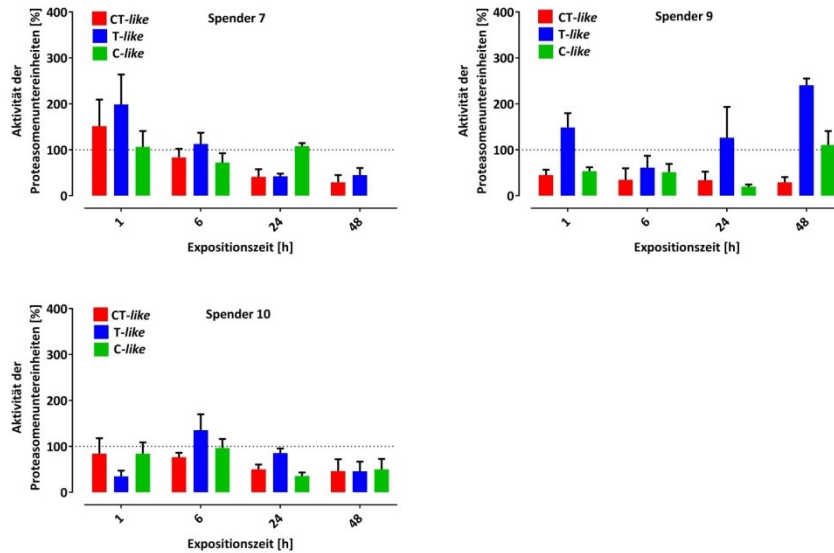
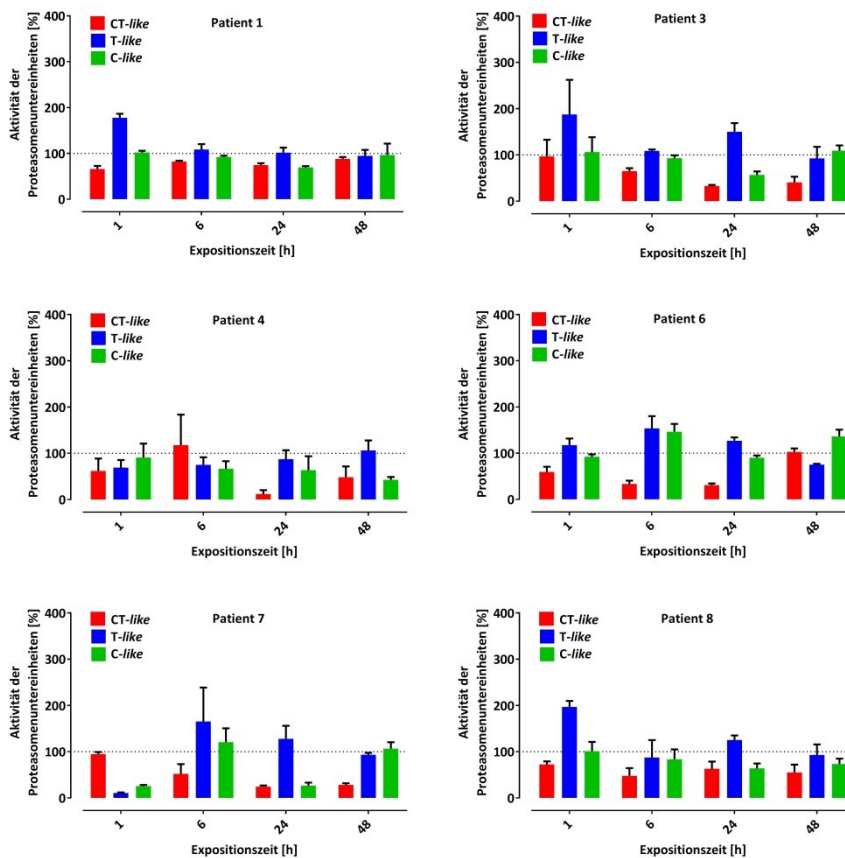


Abbildung A.7: Expositionszeit-abhängige Inhibition der katalytischen Proteasomenuntereinheiten in Osteoblasten von Normalspendern. Mittlere Inhibition \pm Standardabweichung der CT-, T- und C-like Proteasomenaktivität in Osteoblasten von Normalspendern ($n = 7$) nach 1 h, 6 h, 24 h und 48 h Exposition mit 5 nM Bortezomib. Unabhängig vom Ursprung der Osteoblasten wurde im Mittel die CT-like Proteasomenuntereinheit Expositionszeit-abhängig am potentesten durch Bortezomib inhibiert. Eine kompensatorische Gegenregulation der T-like Proteasomenuntereinheit wurde beobachtet (100 % Aktivität der Proteasomenuntereinheiten = gestrichelte Linie).



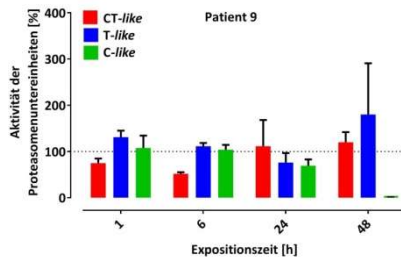


Abbildung A.8: Expositionszeit-abhängige Inhibition der katalytischen Proteasomenuntereinheiten in Osteoblasten von Patienten. Mittlere Inhibition \pm Standardabweichung der CT-, T- und C-like Proteasomenaktivität in Osteoblasten von Patienten mit Multiplen Myelom ($n = 7$) nach 1 h, 6 h, 24 h und 48 h Exposition mit 5 nM Bortezomib. Unabhängig vom Ursprung der Osteoblasten wurde im Mittel die CT-like Proteasomenuntereinheit Expositionszeit-abhängig am potentesten durch Bortezomib inhibiert. Eine kompensatorische Gegenregulation der T-like Proteasomenuntereinheit wurde beobachtet (100 % Aktivität der Proteasomenuntereinheiten = gestrichelte Linie).

7.3 Zusammenhang zwischen der Expression der enzymatischen Proteasomenuntereinheiten und der intrazellulären Bortezomibakkumulation, der inhibitorischen Potenz an den Proteasomenuntereinheiten, dem ereignisfreien Überleben und dem Gesamtüberleben

7.3.1 Zusammenhang zwischen der Expression der enzymatischen Proteasomenuntereinheiten und der intrazellulären Bortezomibakkumulation nach 6 bzw. 24 h Exposition mit 5 nM Bortezomib

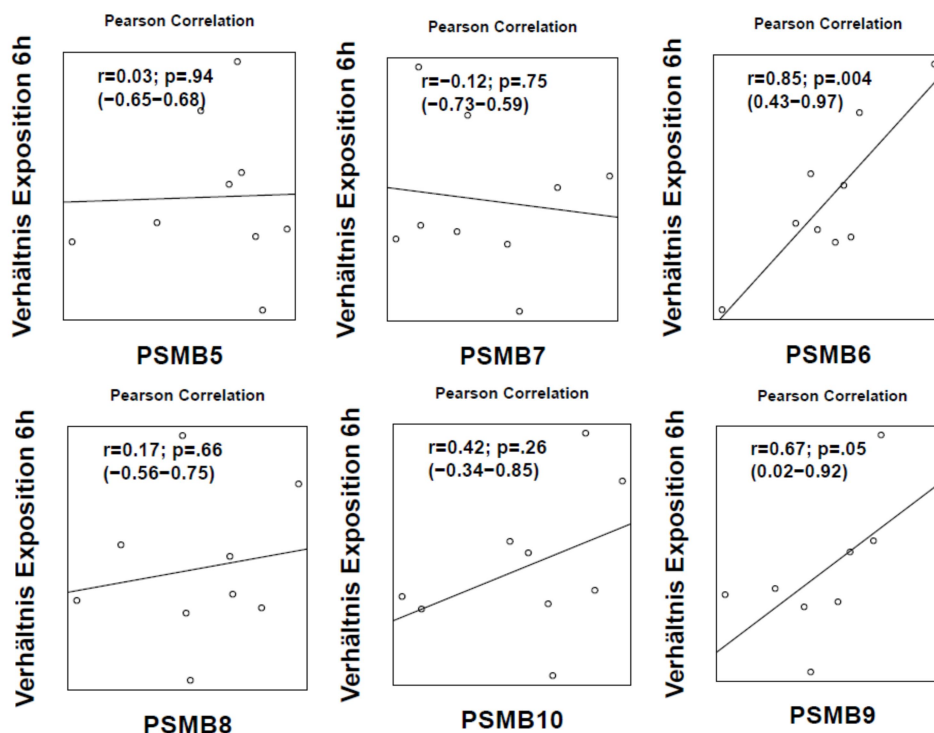


Abbildung A.9: Korrelation der intrazellulären Bortezomibkonzentration nach 6 h Exposition mit 5 nM Bortezomib mit der Expression der konstitutiven und Immun-Proteasomenuntereinheiten. Zur Korrelationsanalyse wurde die Bortezomibkonzentration zum Zeitpunkt der maximalen Akkumulation (6 h) in den Multiplen Myelomzelllinien ($n = 9$) mit der durch *gene expression profiling* ermittelten Expression der CT- (PSMB5), T- (PSMB7), C- (PSMB6), CT_i- (PSMB8), T_i- (PSMB10) und C_i-like (PSMB9) Proteasomenuntereinheiten in Bezug gesetzt. Die Expression der C- ($p = 0,004$) und C_i-like ($p = 0,05$) Proteasomenuntereinheiten korrelierte mit der intrazellulären Bortezomibakkumulation. Für alle anderen Proteasomenuntereinheiten konnte keine signifikante Korrelation ermittelt werden. Die Korrelationsanalyse erfolgte mit Hilfe der nicht-parametrischen Spearman-Korrelation.

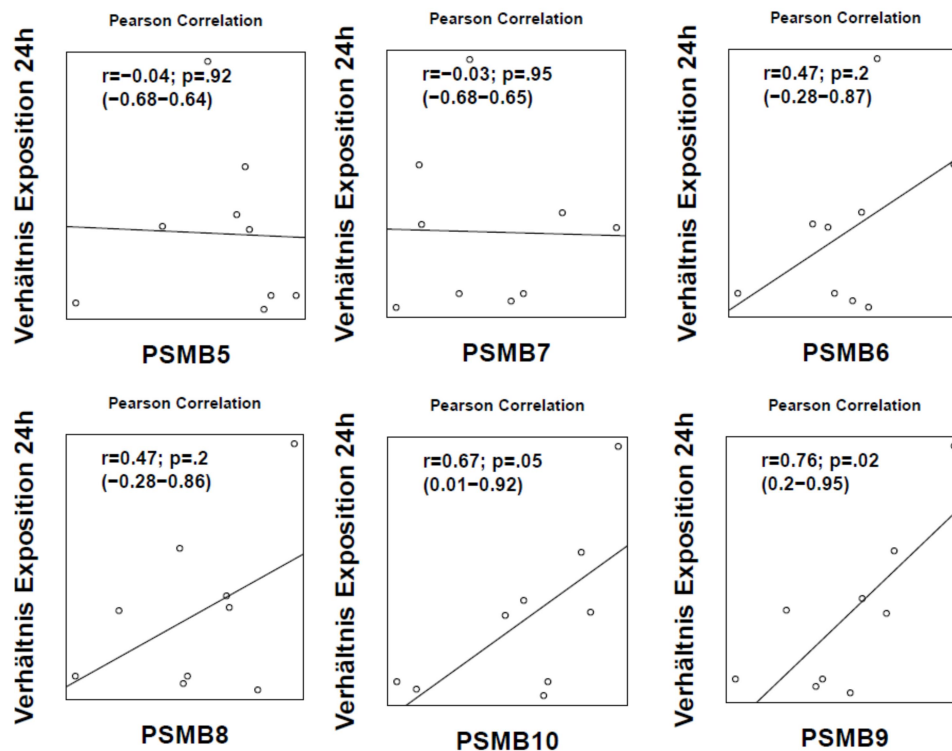
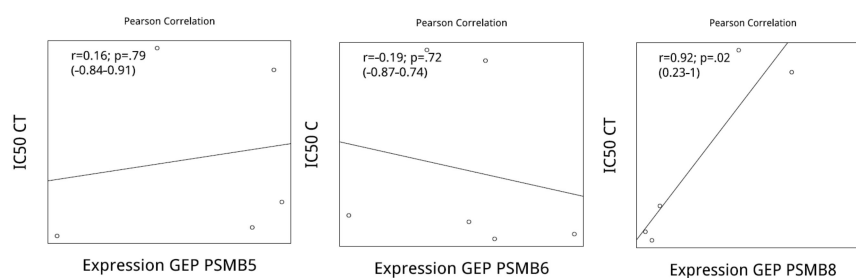


Abbildung A.10: Korrelation der intrazellulären Bortezomibkonzentration nach 24 h Exposition mit 5 nM Bortezomib mit der Expression der konstitutiven und Immun-Proteasomenuntereinheiten. Zur Korrelationsanalyse wurde die Bortezomibkonzentration zum Zeitpunkt der maximalen Akkumulation (24 h) in Myelomzelllinien ($n = 9$) mit der durch *gene expression profiling* ermittelten Expression der CT- (PSMB5), T- (PSMB7), C- (PSMB6), CT_i- (PSMB8), T_i- (PSMB10) und C_i-like (PSMB9) Proteasomenuntereinheiten in Bezug gesetzt. Die Expression der T_i- ($p = 0,05$) und C_i-like ($p = 0,02$) Proteasomenuntereinheiten korrelierte mit der intrazellulären Bortezomibakkumulation. Für alle anderen Proteasomenuntereinheiten konnte keine signifikante Korrelation ermittelt werden. Die Korrelationsanalyse erfolgte mit Hilfe der nicht-parametrischen Spearman-Korrelation.

7.3.2 Zusammenhang zwischen der Expression und der inhibitorischen Potenz (IC_{50}) von Bortezomib an den enzymatischen Proteasomenuntereinheiten



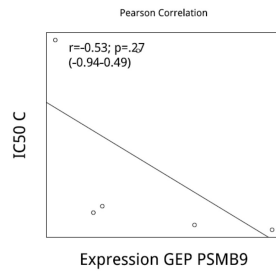
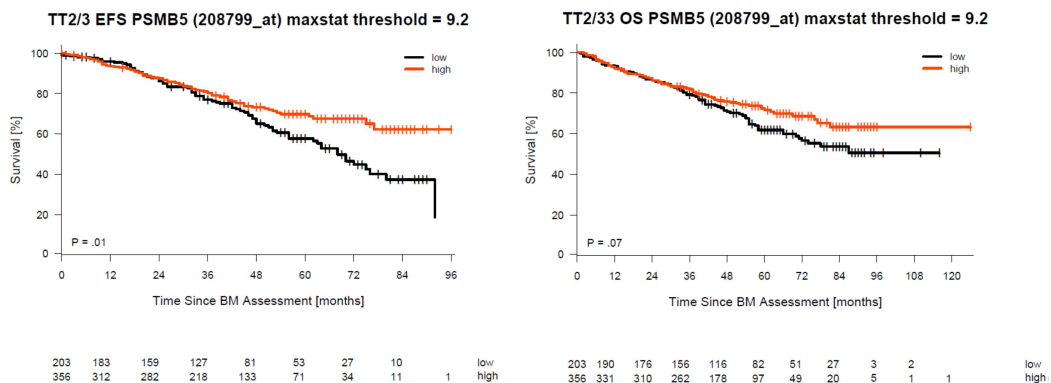


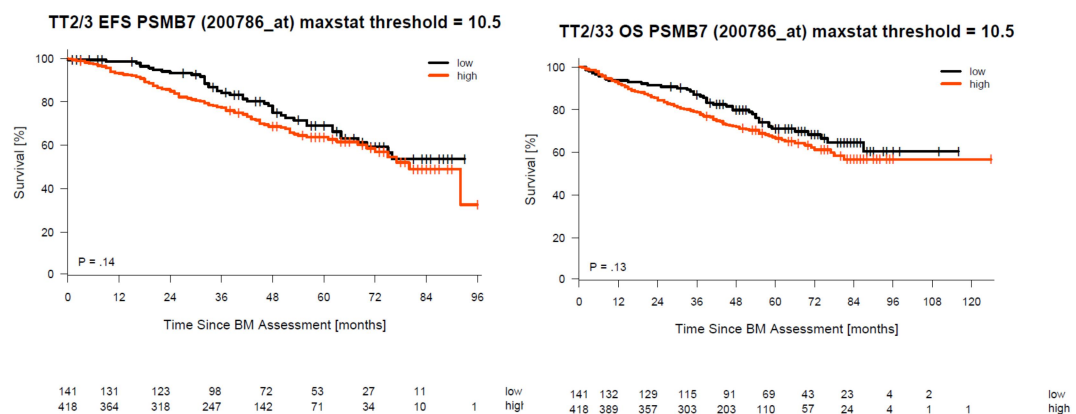
Abbildung A.11: Korrelation der inhibitorischen Potenz (IC₅₀) an den CT-, T-, CT_i und T_i-like Proteasomenuntereinheiten mit deren Expressionsstärke in Zelllinien des Multiplen Myeloms. Zur Korrelationsanalyse wurde die IC₅₀ der Multiplen Myelomzelllinien (n = 5) nach 1 h Exposition mit 0,001-10 µM Bortezomib mit der durch *gene expression profiling* (GEP) ermittelten Expression der CT- (PSMB5), C- (PSMB6), CT_i- (PSMB8), und C_i-like (PSMB9) Proteasomenuntereinheiten in Bezug gesetzt. Die Expression der CT_i-like Proteasomenuntereinheit korrelierte ($p = 0,02$) mit der IC₅₀ dieser Proteasomenuntereinheit. Für alle anderen Proteasomenuntereinheiten konnte keine signifikante Korrelation ermittelt werden. Die Korrelationsanalyse erfolgte mit Hilfe der nicht-parametrischen Spearman-Korrelation.

7.3.3 Zusammenhang zwischen der Expression der enzymatischen Proteasomenuntereinheiten und dem ereignisfreien Überleben und Gesamtüberleben in Patienten mit Multiplem Myelom in der Validierungskohorte

A



B



C

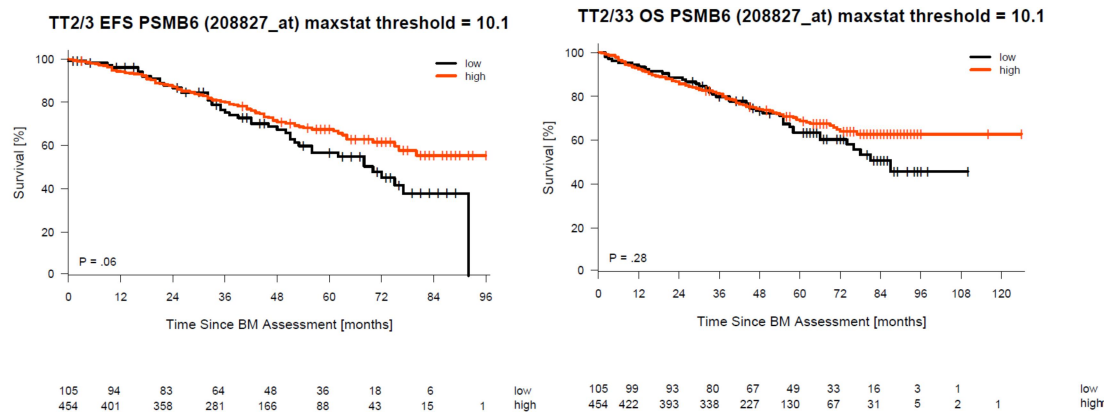
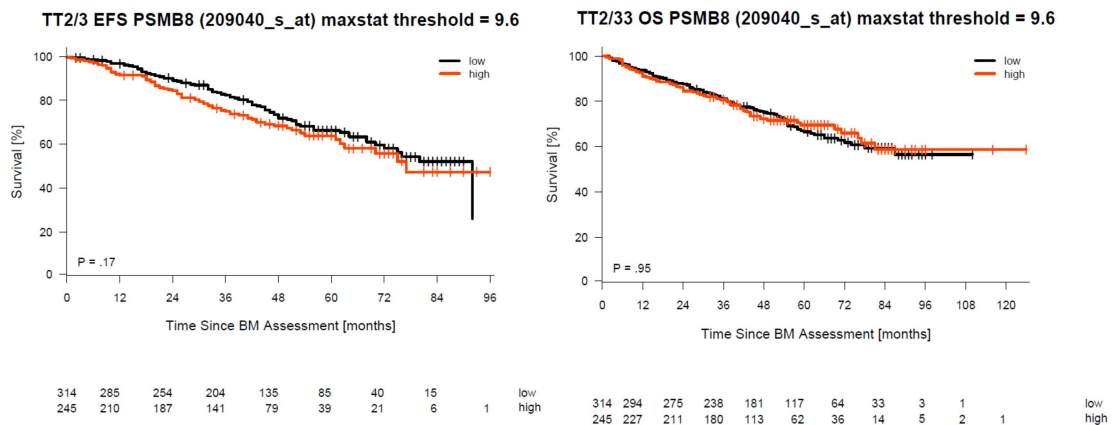
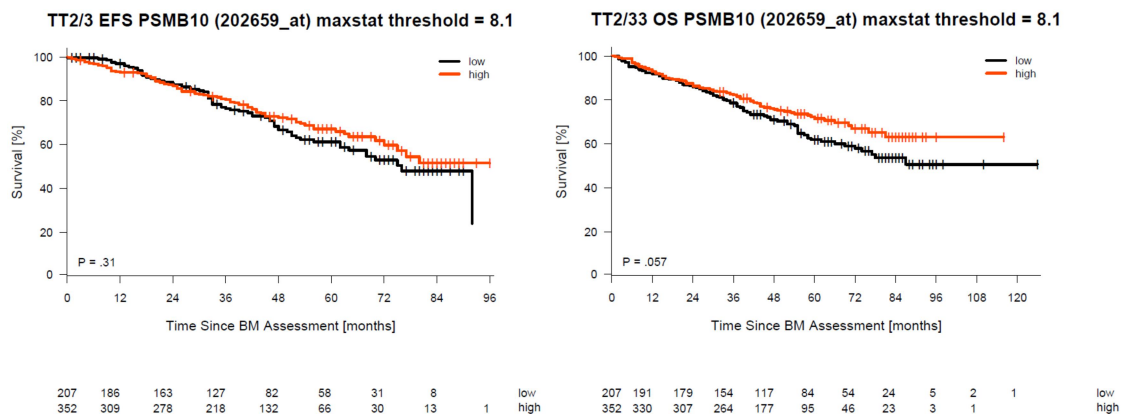


Abbildung A.12: Zusammenhang zwischen der Expression der katalytisch aktiven, konstitutiven Proteasomenuntereinheiten und dem ereignisfreien Überleben (*event-free survival*, EFS) und Gesamtüberleben (*overall survival*, OS) in der TT2/TT3 Validierungskohorte. Überlebenszeitanalyse durch Anwendung des Kaplan-Meier-Schätzers in einer Kohorte symptomatischer Patienten mit Multiplen Myelom zur Vorhersage des ereignisfreien Überlebens und Gesamtüberlebens (n = 559) in Abhängigkeit von der niedrigen (schwarz) und hohen Expression (rot) der (A) CT- (PSMB5), (B) T- (PSMB7) und (C) C-like (PSMB6) Proteasomenuntereinheiten. Die Zuordnung der Expressionsstärke (niedrig/hoch) erfolgte mittels *maximally selected rank statistics* auf Basis des vorangegangenen *gene expression profiling*. Hohe Expressionslevel der CT- und C-like Proteasomenuntereinheit korrelierten mit einem längeren ereignisfreien Überleben (p = 0,01 und p = 0,04). Für die T-like Proteasomenuntereinheit konnte keine Korrelation mit dem ereignisfreien Überleben oder Gesamtüberleben ermittelt werden.

A



B



C

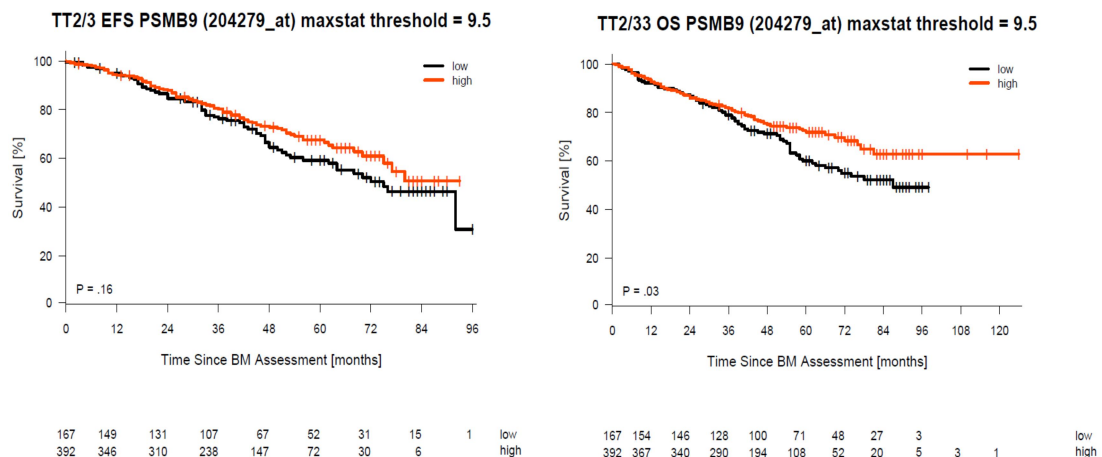
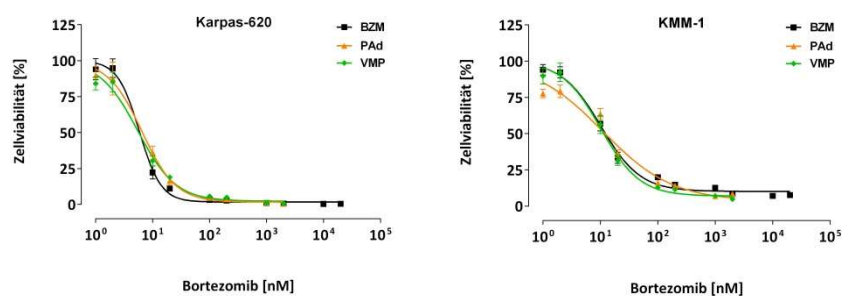


Abbildung A.13: Zusammenhang zwischen der Expression der katalytisch aktiven Immun-Proteasomenuntereinheiten und dem ereignisfreien Überleben (*event-free survival*, EFS) und Gesamtüberleben (*overall survival*; OS) in der TT2/TT3 Validierungskohorte. Überlebenszeitanalyse durch Anwendung des Kaplan-Meier-Schätzers einer Kohorte symptomatischer Patienten mit Multiplen Myelom zur Vorhersage des ereignisfreien Überleben und Gesamtüberleben (n = 559) in Abhängigkeit von der niedrigen (schwarz) und hohen Expression (rot) der (A) CT_i- (PSMB8), (B) T_i- (PSMB10) und (C) C_i-like (PSMB9) Proteasomenuntereinheiten. Die Zuordnung der Expressionsstärke (niedrig/hoch) erfolgte mittels *maximally selected rank statistics* auf Basis des vorangegangenen *gene expression profiling*. Für die hohe Expression der C_i-like Proteasomenuntereinheiten wurde ein signifikanter Zusammenhang mit dem Gesamtüberleben (p = 0,03) gezeigt.

7.4 Sensitivität der Myelomzellen gegenüber Bortezomib und inhibitorischen Potenz an den Proteasomenuntereinheiten von Bortezomib innerhalb der Kombinationstherapieregime PAd und VMP

7.4.1 Konzentrations-Wirkungs-Kurven von Zelllinien des Multiplen Myeloms von Bortezomib innerhalb der Kombinationstherapieregime PAd und VMP nach 24 h Exposition



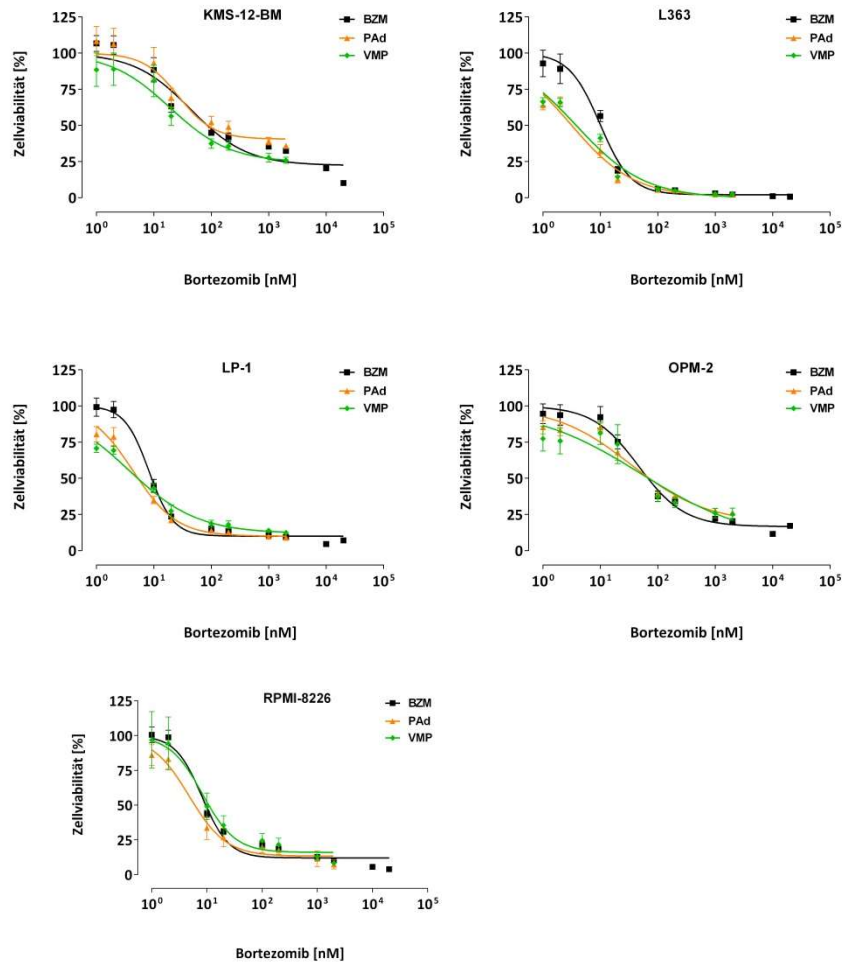
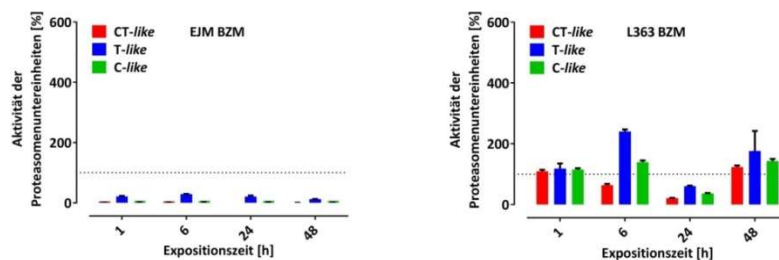


Abbildung A.14: Vergleich der Konzentrations-Wirkungs-Kurven von 0,001-10 μ M Bortezomib allein oder in Kombination mit 300 nM Dexamethason, 200 nM Doxorubicin (PAd, orange) und 3,1 μ M Prednisolon und 600 nM Melphalan (VMP, grün) in Bezug auf die Zellviabilität Multipler Myelomzelllinien nach 24 h Expositionszeit. Dargestellt sind die Konzentrations-Wirkungs-Kurven jeder Multiplen Myelomzelllinie ($n = 7$) als Mittelwerte \pm Standardabweichung für $n = 4$ biologische Replikate nach Exposition mit 0,001-10 μ M Bortezomib bzw. innerhalb der Kombinationstherapieregime PAd und VMP

7.4.2 Einfluss der Expositionsdauer von 5 nM Bortezomib allein oder innerhalb der Kombinationstherapieregime PAd und VMP auf die Aktivität der Proteasomenuntereinheiten



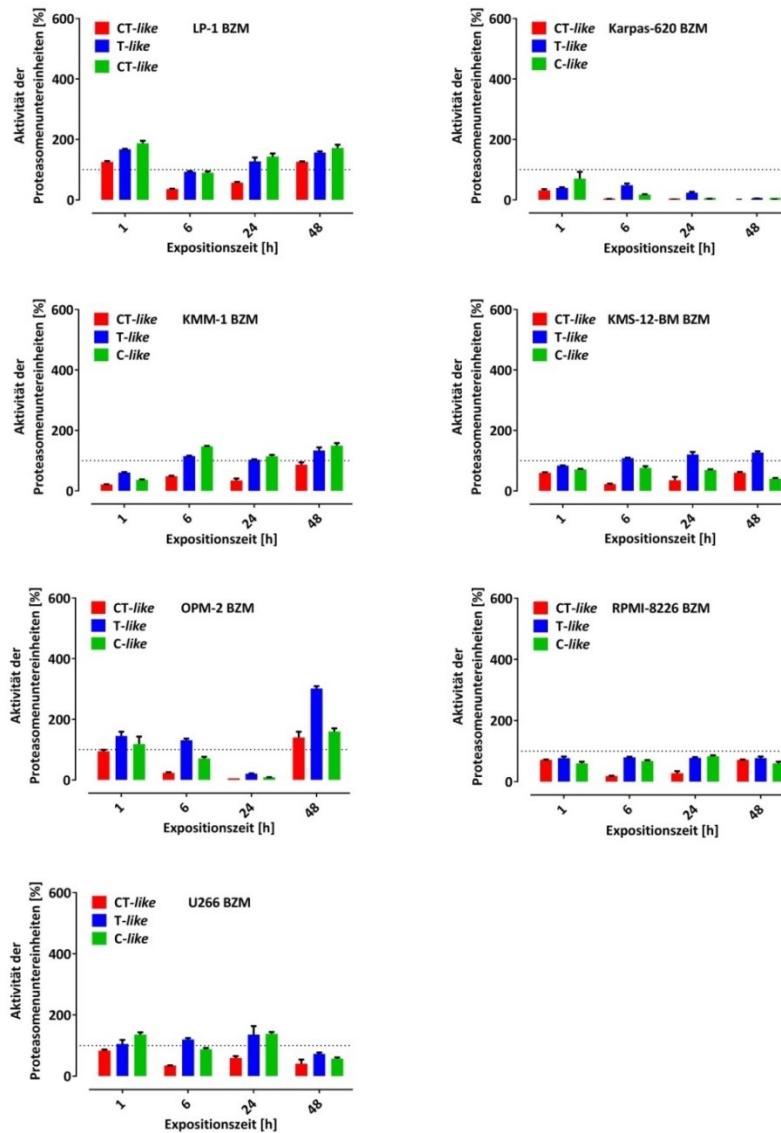
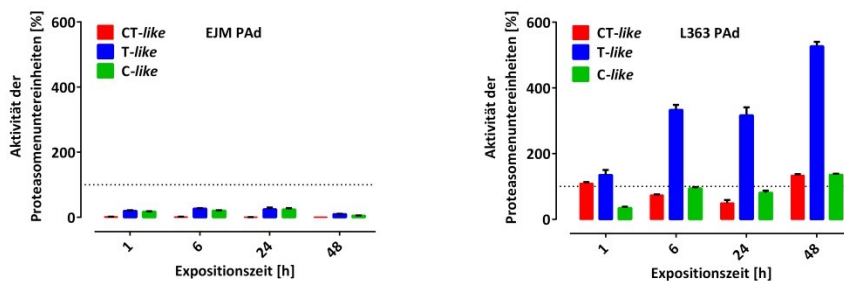


Abbildung A.15: Expositionszeit-abhängige Inhibition der katalytischen Aktivität der Proteasomenuntereinheiten [%] in Multiplen Myelomzelllinien durch 5 nM Bortezomib allein. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm Standardabweichung der untersuchten Multiplen Myelomzelllinien ($n = 7$) der Aktivität der CT-, T- und C-like Proteasomenuntereinheiten [%] nach 1 h, 6 h, 24 h und 48 h Exposition mit 5 nM Bortezomib allein.



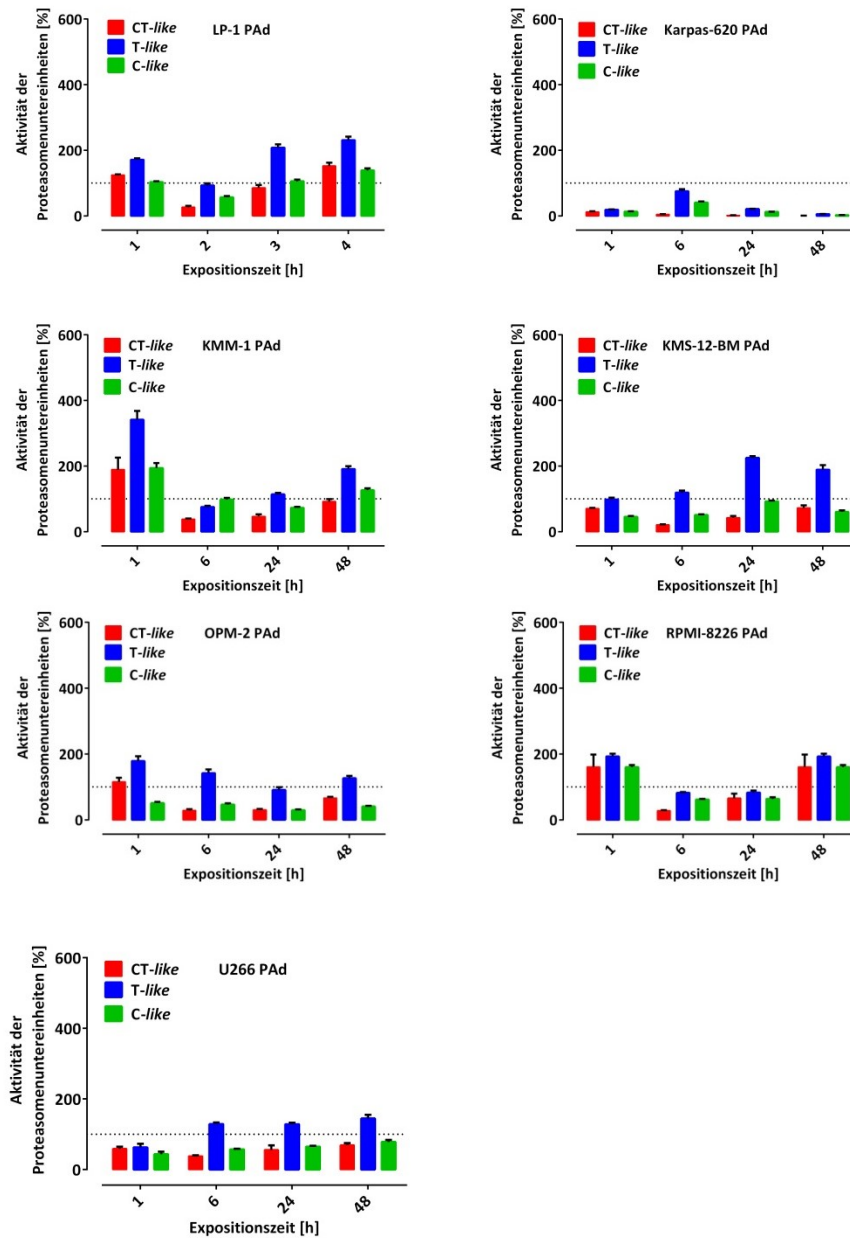


Abbildung A.16: Expositionszeit-abhängige Inhibition der katalytischen Aktivität der Proteasomenuntereinheiten [%] in Multiplen Myelomzelllinien durch 5 nM Bortezomib in Kombination mit 200 nM Doxorubicin und 300 nM Dexamethason (PAd). Dargestellt sind die Mittelwerte \pm Standardabweichung der untersuchten Multiplen Myelomzelllinien ($n = 7$) der Aktivität der CT-, T- und C-like Proteasomenuntereinheiten [%] nach 1 h, 6 h, 24 h und 48 h Exposition mit 5 nM Bortezomib innerhalb des Kombinationstherapieprogrammes PAd.

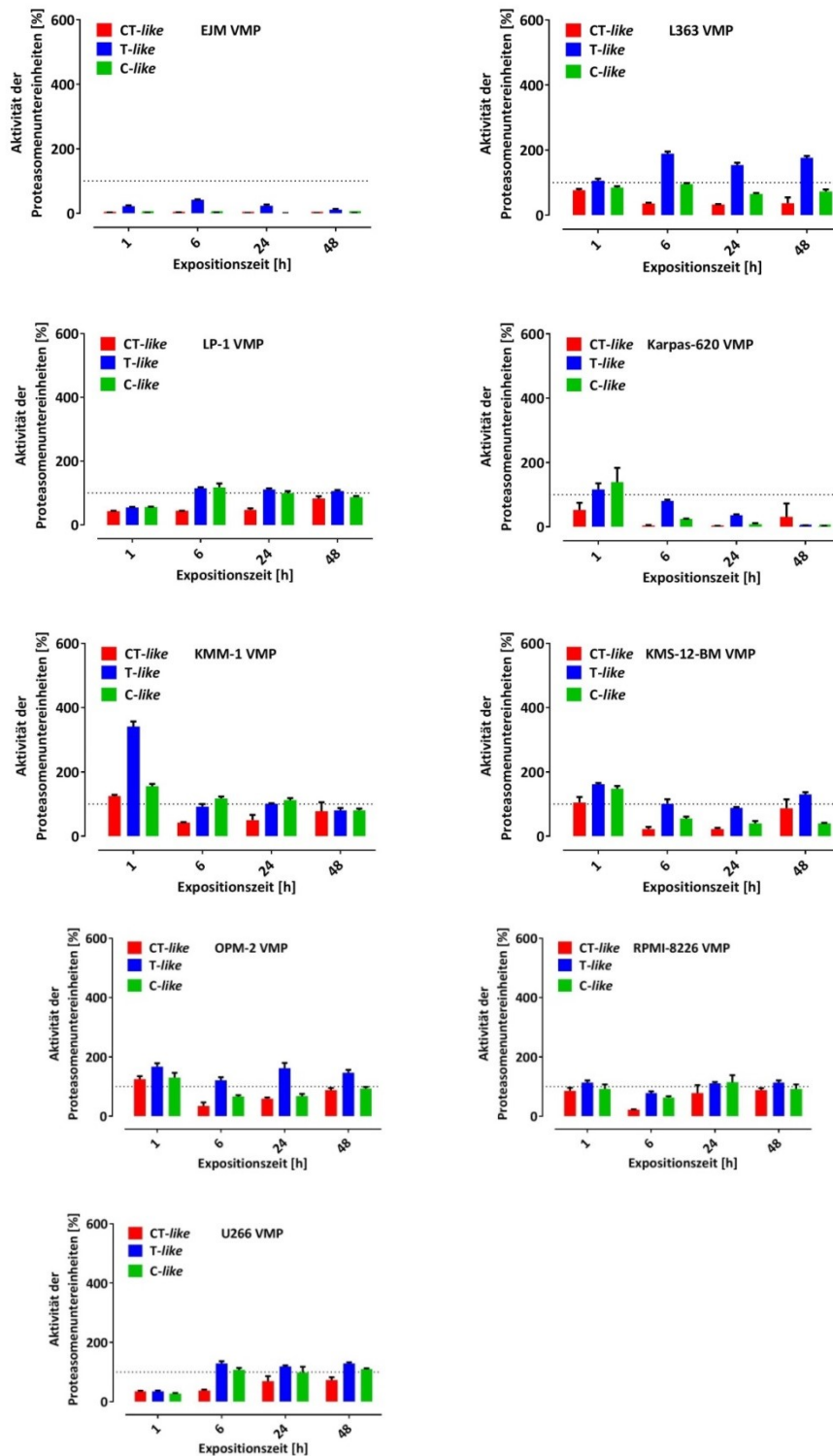


Abbildung A.17: Expositionszeit-abhängige Inhibition der katalytischen Aktivität der Proteasomenuntereinheiten [%] in Multiplen Myelomzelllinien durch 5 nM Bortezomib in Kombination mit 600 nM Melphalan und 3,1 µM Prednisolon (VMP). Dargestellt sind die Mittelwerte \pm Standardabweichung der untersuchten Multiplen Myelomzelllinien ($n = 7$) der Aktivität der CT-, T- und C-like Proteasomenuntereinheiten [%] nach 1 h, 6 h, 24 h und 48 h Exposition mit 5 nM Bortezomib innerhalb des Kombinationstherapieregimes VMP.

7.5 Sensitivität der Myelomzellen gegenüber Bortezomib in Kombination mit selektiven Endothelinrezeptor-Antagonisten

7.5.1 Sensitivität der Myelomzellen gegenüber Bortezomib allein, sowie in Kombination mit 0,1 bzw. 10 μM BQ123 und BQ788 nach 48 h Expositionszeit

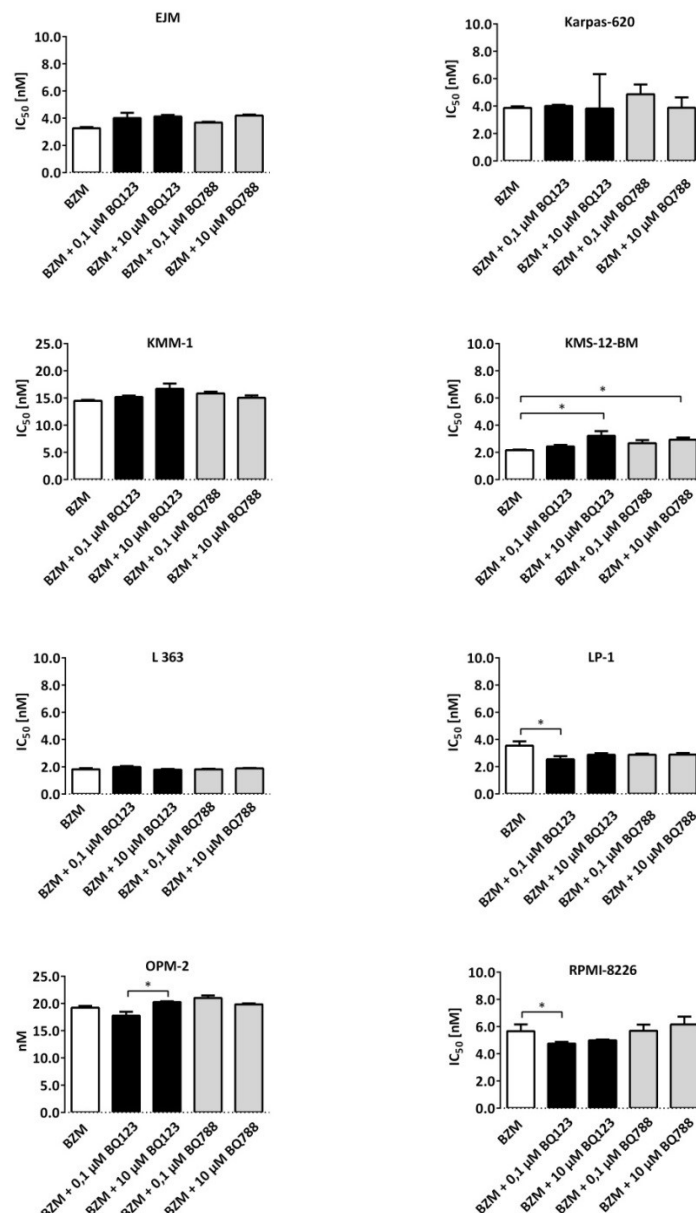


Abbildung A.18: Vergleich der IC_{50} nach 48 h Exposition mit Bortezomib allein oder in Kombination mit 0,01 oder 10 μM BQ123 oder BQ788 in Bezug auf die Zellviabilität Multipler Myelomzelllinien. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm Standardabweichung der antiproliferativen Potenz (IC_{50}) von Bortezomib ($n = 4$ biologische Replikate) nach 48-stündiger Exposition Multipler Myelomzelllinien ($n = 7$) gegenüber 0,002-10 μM Bortezomib allein oder in Kombination mit 0,01 und 10 μM BQ123 oder BQ788. Einen signifikanten Effekt von 0,1 μM BQ123 gegenüber der Behandlung von Bortezomib allein war lediglich in der Zelllinie LP-1 zu beobachten. Die statistische Analyse wurde mittels Kruskal-Wallis Test mit *post hoc* Dunn's multiple comparison Test durchgeführt.

7.5.2 Konzentrations-Wirkungs-Kurven von Zelllinien des Multiplen Myeloms von Bortezomib allein oder in Kombination mit 100 μ M Bosentan nach 5 Tagen Expositionszeit

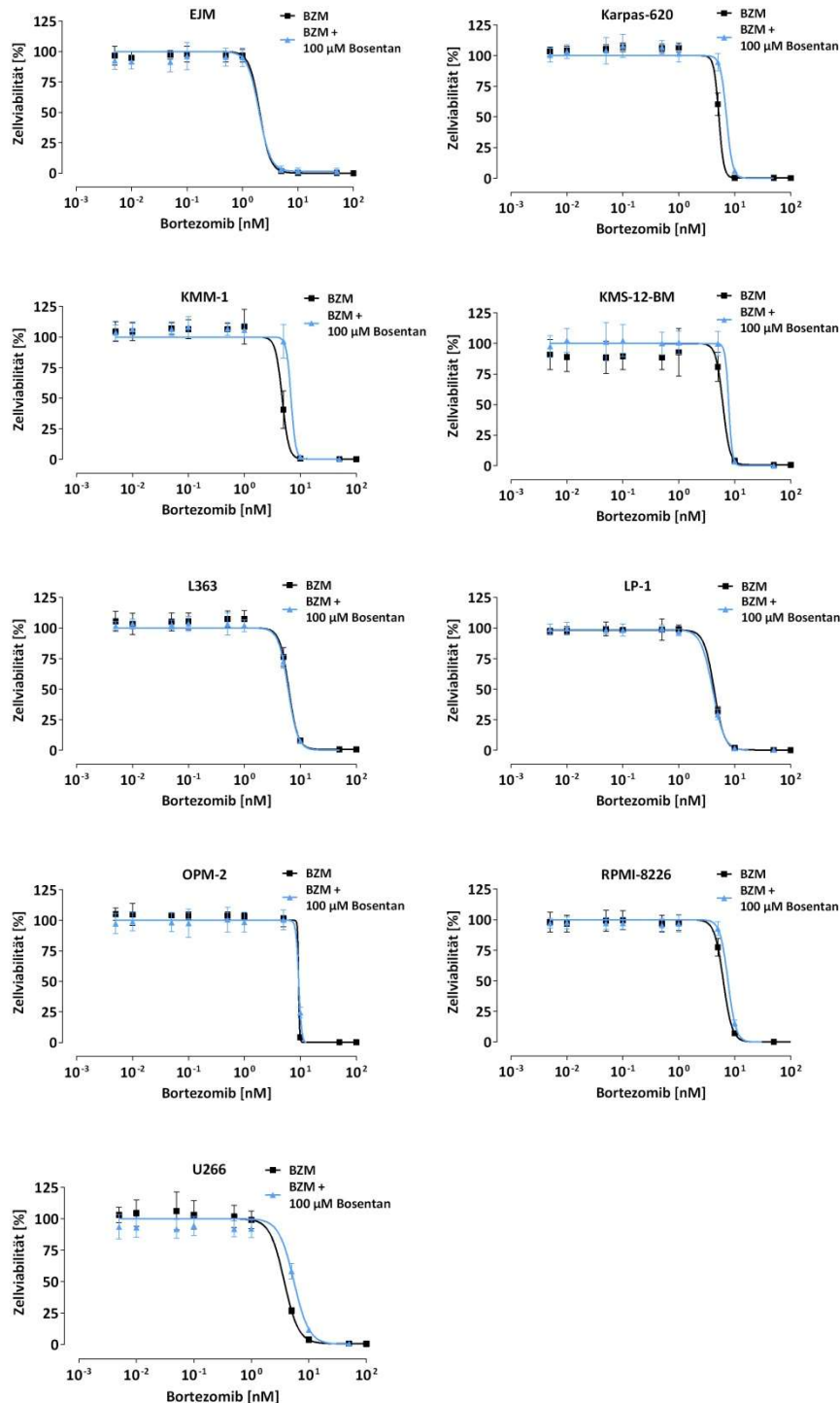


Abbildung A.19: Vergleich der Konzentrations-Wirkungs-Kurven von Bortezomib allein oder in Kombination mit 100 μ M Bosentan in Bezug auf die Zellviabilität Multipler Myelomzelllinien nach 5 Tagen Expositionszeit. Dargestellt sind die Konzentrations-Wirkungs-Kurven jeder Multiplen Myelomzelllinie ($n = 9$) als Mittelwerte \pm Standardabweichung für $n = 4$ biologische Replikate nach Exposition mit 0,005-100 nM Bortezomib bzw. zusätzlich 100 μ M Bosentan (blau).

Danksagung

Mein großer Dank gilt meinem Doktorvater Herrn Prof. Dr. med. Walter Emil Haefeli für die Möglichkeit innerhalb seiner Abteilung promoviert zu werden. Seine fachkompetente, kreative und visionäre Art waren mir stets ein Vorbild. Die interdisziplinäre Ausbildung hat meine persönliche Entwicklung gefördert und spannende wissenschaftliche Diskussionen haben zum Fortschritt der Dissertation beigetragen.

Mein ganz besonderer Dank gilt meiner Betreuerin der Doktorarbeit Prof. Dr. rer. nat. Johanna Weiß. Durch ihre herausragende wissenschaftliche und zwischenmenschliche Betreuung hat sie viel zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen. Sie stand mir bei allen Hoch- und Tiefphasen der Promotion als moralische und kollegiale Unterstützung zur Seite. Besonders schätze ich ihre offene Art, ihre Loyalität gegenüber ihren Mitarbeitern, ihre Zuverlässigkeit und Empathie. Vielen Dank für die wertvolle Unterstützung während meiner Promotion.

Meinem Kollegen und Mentor Herr PD Dr. rer. nat. Dirk Theile möchte ich auch sehr danken. Ohne seine fachliche und freundschaftliche Unterstützung wären viele Projekte meiner Forschung nicht das geworden, was sie sind. Insbesondere seine facettenreiche fachliche Kompetenz, sein Talent für wissenschaftliche Projektentwicklung besonders im Hinblick auf Publikationen und seinen Optimismus bewundere ich sehr. Sein Engagement, Motivation, Verständnis und Humor haben meine Promotionszeit wesentlich geprägt.

Ebenfalls danken möchte ich Herrn Dr. rer. nat. Jürgen Burhenne für die unkomplizierte Zusammenarbeit. Trotz vieler technischer Herausforderungen setzte er sich immer für die zeitnahe Messung aller generierten Proben unter Anwendung der höchsten Qualitätsstandards ein, ohne die diese Promotion nicht möglich gewesen wäre.

Ich danke Frau Dr. med. Anja Seckinger und Herrn PD Dr. med. Dr. biol. hom. Dirk Hose für die akademische Zusammenarbeit. Viele der von ihnen generierten wissenschaftlichen Ideen und Methoden bildeten die Grundlage meiner Forschung. Danke auch für die Bereitstellung der primären Spender- und Patientenproben, den GEP-Daten und einiger statistischer Auswertungen.

Dank sagen möchte ich auch für die finanzielle Unterstützung im Rahmen des SFB/TRR 79 durch die Deutsche Forschungsgemeinschaft.

Herzlich danken möchte ich den Teammitgliedern des Molekularbiologisch/Biochemischen Labors, die mir mit vielen praktischen Tipps und Unterstützung im Labor zur Seite standen. Ebenso für die Unterstützung der Kollegen aus dem Analytisch-Chemischen Labor unserer Abteilung und aus dem Labor für Myelomforschung der Abteilung Innere Medizin V des Universitätsklinikums Heidelberg.

Mein letzter und allergrößter Dank gilt meinen Eltern und meinem Mann Thomas. Ohne den Rückhalt und den Glauben an mich wäre all das nicht möglich gewesen. Trotz aller Steine und Hürden habt ihr mich zu dem Menschen gemacht, der ich heute bin. Ich danke euch wirklich von ganzem Herzen dafür, dass ihr mir immer die Freiheiten gegeben habt mich zu verwirklichen und meine Träume zu leben. Danke für eure grenzenlose Unterstützung.